



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Ivana Račić

**GENETIČKA RAZNOLIKOST  
BAKTERIJA *COXIELLA BURNETII* U  
HRVATSKOJ**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2012.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE  
DIVISION OF BIOLOGY

Ivana Račić

**GENETIC DIVERSITY OF BACTERIA  
*COXIELLA BURNETII* IN CROATIA**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2012.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Laboratoriju za bakterijske zoonoze i molekularnu dijagnostiku bakterijskih bolesti Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Silvia Špičića, znanstvenog savjetnika, i doc. dr. sc. Ane Galov, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

*Zahvaljujem mentoru dr. sc. Silviu Špičiću na stručnoj pomoći i strpljenju pri izradi doktorskog rada. Mentorici doc. dr. sc. Ani Galov zahvaljujem na razumijevanju i korisnim savjetima.*

*Ravnatelju Hrvatskog veterinarskog instituta, prof. dr. sc. Željku Cvetniću zahvaljujem jer je nama djelatnicima Instituta omogućio rad u vrhunski opremljenim laboratorijima i okruženju u kojem se ljude potiče na profesionalni razvoj i napredovanje u znanju i stručnim vještinama.*

*Doc. dr. sc. Borisu Habrunu zahvaljujem na ukazanom povjerenju i uspješnoj suradnji.*

*Zahvaljujem članicama povjerenstva, prof. dr. sc. Jasni Hrenović na susretljivosti i podršci, a prof. dr. sc. Branki Šeol na velikom trudu i vremenu koje je uložila kako bi mi pomogla kvalitetno uobličiti ovaj rad.*

*Hvala dragoj kolegici dr. sc. Sanji Duvnjak koja mi pruža najveću pomoć u mom svakodnevnom poslu, pa tako i u izradi ovog rada. Kolegici Anji Vujnović, dr. med. vet. zahvaljujem na svim silnim izolacijama DNA i motivirajućim razgovorima.*

*Dr. sc. Maji Zdelar-Tuk zahvaljujem na prijateljskim savjetima, poticanju da ustrajem i strpljivom slušanju mojih žalopojki.*

*Zahvaljujem tehničkim suradnicama Valeriji Podgorski, Silviji Drašković, Kseniji Perković, Marijani Novosel i Anđeli Krčelić na podršci tijekom izrade rada i veseloj atmosferi pri obavljanju svakodnevnih poslova u Laboratoriju. I na kolačima.*

*Hvala roditeljima koji su uvijek vjerovali u mene, a bratu na tehničkoj podršci pri izradi rada. Posebno zahvaljujem svome ujaku Kreši koji mi je pomogao izabrati moj profesionalni put i podržava me na svakom njegovom koraku.*

*Napokon, zahvaljujem svima onima koji su mi na bilo koji način pomogli pri izradi ovog rada, a nisu ponaosob spomenuti.*

---



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Doktorski rad

**GENETIČKA RAZNOLIKOST  
BAKTERIJA *COXIELLA BURNETII* U HRVATSKOJ**

IVANA RAČIĆ

Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

Bakterijska vrsta *Coxiella burnetii* je vrlo infektivna bakterija i obvezatni unutarstanični parazit. U ljudi i životinja uzrokuje Q-groznicu koja je raširena po cijelom svijetu. U ovom radu su po prvi put genotipizirani sojevi vrste *C. burnetii* u Hrvatskoj metodom MLVA (*Multi Locus VNTR Analysis, Variable Number of Tandem Repeats*) koja se u svijetu tek uvodi kao metoda za genotipizaciju bakterije *C. burnetii*. Metoda je primijenjena na 49 uzoraka podrijetlom od domaćih životinja, 15 uzoraka je u potpunosti tipizirano, a njih 14 svrstano je u jedan od 10 dobivenih genotipova. Dva genotipa srodnija su s genotipovima u svijetu nego s hrvatskim genotipovima, a karakteristični su za kontinentalni dio Hrvatske. Ostali genotipovi srodniji su međusobno nego sa stranim genotipovima, a karakteristični su za primorski dio Hrvatske. Metoda MLVA uvedena je kao rutinski dijagnostički postupak čime je omogućeno utvrđivanje izvora i puteva širenja infekcije što će pridonijeti kontroli i suzbijanju bolesti u domaćih životinja koje su ujedno primarni izvor zaraze za ljude.

(132 stranice, 40 slika, 30 tablica, 136 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

**Ključne riječi:** *Coxiella burnetii*, genotipizacija, MLVA, Q-groznica, genetička raznolikost

Mentori: Dr. sc. Silvio Špičić, znanstveni savjetnik

Doc. dr. sc. Ana Galov

Ocjenjivači: Prof. dr. sc. Jasna Hrenović

Doc. dr. sc. Ana Galov

Prof. dr. sc. Branka Šeol

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Division of Biology

Doctoral Thesis

**GENETIC DIVERSITY OF  
BACTERIA *COXIELLA BURNETII* IN CROATIA**

IVANA RAČIĆ

Croatian Veterinary Institute, Zagreb

*Coxiella burnetii* is very infectious intracellular bacterium. In humans and animals it causes Q-fever which is spread all around the world. This study was the first time of genotyping *C. burnetii* strains in Croatia. The strains were genotyped using MLVA (Multi Locus VNTR Analysis, Variable Number of Tandem Repeats) method, a method recently introduced for the *C. burnetii* genotyping in the world. The 49 domestic animals' samples were genotyped, 15 samples were typed completely and 14 of them were assigned to one of 10 obtained genotypes. Two genotypes are more similar to the genotypes in the world than to other genotypes in Croatia and they are typical for continental part of Croatia. All other genotypes are more similar to each other than to foreign genotypes. These genotypes are typical for the coastal part of Croatia. The MLVA was implemented as tool for locating the source of the infection and the route of transmission which is essential in prevention and controlling the disease.

(132 pages, 40 figures, 30 tables, 136 references, original in Croatian)

**Keywords:** *Coxiella burnetii*, genotyping, MLVA, Q-fever, genetic diversity

Supervisors: *Silvio Špičić, PhD, Senior Research Scientist*  
*Ana Galov, PhD, Assist. Prof.*

Reviewers: *Jasna Hrenović, PhD, Full Prof.*  
*Ana Galov, PhD, Assist. Prof.*  
*Branka Šeol, PhD, Full Prof.*

---

## SADRŽAJ:

1.	UVOD .....	1
1.1.	Cilj rada .....	3
2.	LITERATURNI PREGLED .....	4
2.1.	Povijesni pregled.....	5
2.2.	Bakteriologija .....	6
2.2.1.	Bakterija <i>Coxiella burnetii</i> .....	6
2.2.2.	Genom bakterije <i>C. burnetii</i> .....	7
2.2.3.	Plazmidi .....	9
2.2.4.	Bakterije faze I i faze II .....	10
2.2.5.	Morfološki oblici i preživljenje bakterije .....	11
2.2.6.	Ulazak u eukariotsku stanicu .....	13
2.2.7.	Apoptoza inficiranih stanica .....	15
2.3.	Epidemiologija.....	16
2.3.1.	Načini prijenosa .....	16
2.3.2.	Prijenos sa životinja.....	17
2.3.3.	Geografska rasprostranjenost.....	18
2.3.4.	Q-groznica u Hrvatskoj .....	23
2.4.	Patogeneza i patologija.....	26
2.4.1.	Patogeneza .....	26
2.4.2.	Infekcija u ljudi .....	27
2.4.3.	Infekcija u životinja.....	29
2.4.4.	Liječenje Q-groznice u ljudi .....	30
2.4.5.	Cjepivo protiv Q-groznice .....	31
2.4.6.	Bakterija <i>C. burnetii</i> kao biološko oružje.....	32

---

2.4.7.	Eksperimenti s bakterijom <i>C. burnetii</i> .....	33
2.5.	Dijagnostika infekcije bakterijom <i>C. burnetii</i> .....	35
2.5.1.	Metoda MLVA.....	38
3.	MATERIJALI I METODE .....	45
3.1.	Materijali .....	46
3.2.	Metode.....	49
3.2.1.	Metoda RVK.....	49
3.2.2.	Izolacija DNA .....	50
3.2.3.	Utvrđivanje pripadnosti vrsti <i>Coxiella burnetii</i> metodom TRANS ½ PCR.....	52
3.2.4.	QIAxcel sustav .....	53
3.2.5.	Metoda MLVA.....	54
3.2.6.	Primer-BLAST.....	58
3.2.7.	Statistička analiza .....	60
4.	REZULTATI .....	61
4.1.	Utvrđivanje pripadnosti vrsti <i>Coxiella burnetii</i> metodom TRANS ½ PCR.....	62
4.2.	Metoda MLVA .....	67
4.2.1.	Primer-BLAST.....	69
4.2.2.	Tablica broja ponavljanja .....	70
4.2.3.	MLVA genotipovi .....	73
4.2.4.	Usporedba genotipova bakterije <i>C. burnetii</i> s genotipovima u svijetu .....	81
4.3.	Indeks HGDI.....	100
5.	RASPRAVA.....	103
6.	ZAKLJUČAK.....	114
7.	POPIS LITERATURE .....	117
	ŽIVOTOPIS AUTORA .....	132

---

## ***1. UVOD***

Bakterija *Coxiella burnetii* je vrlo infektivna bakterijska vrsta, obvezatni je unutarstanični parazit, a proširena je po cijelom svijetu (Arricau-Bouvery i Rodolakis, 2005.). Izvan živog organizma vrsta *C. burnetii* tvori spore koje su izuzetno otporne na vanjske uvjete, a u kontaminiranom tlu mogu opstati i po nekoliko mjeseci (Heinzen i sur., 1999.). Kako se spore ove bakterije prenose i zrakom, važno je znati da je za infekciju ljudi potrebno manje od 10 spora, pa se stoga vrsta *C. burnetii* smatra potencijalnim biološkim oružjem (Madariaga i sur., 2003.).

U ljudi i životinja bakterija *C. burnetii* uzrokuje bolest nazvanu Q-groznica. U ljudi Q-groznica može proći neopaženo, ali može biti i akutnog ili kroničnog tijeka. Akutna infekcija očituje se glavoboljom, febrilnim epizodama, bolovima u kostima i upalom pluća, a kronična infekcija rezultira hepatitisom, osteomijelitisom i endokarditisom. Ako se bolest ne liječi ili se liječi nedjelotvornim antibioticima, Q-groznica može imati fatalan ishod (Maurin i Raoult, 1999.). Životinje zaražene ovom bakterijom najčešće ne pokazuju simptome infekcije no izvori su infekcije za ljude i druge životinje. U životinja vrsta *C. burnetii* uzrokuje pobačaje i sterilnost. Najčešći način na koji se zaražavaju ljudi i životinje je putem aerosola i prašine koja sadrži ovu bakteriju koja se može nalaziti u mlijeku, fecesu, placenti i vaginalnom sekretu inficiranih životinja (Arricau-Bouvery i Rodolakis, 2005.; Maurin i Raoult, 1999.).

Bakterijska vrsta *C. burnetii* ima širok spektar domaćina, a dokazana je u domaćih i divljih životinja, krpelja, buha, muha i drugih člankonožaca koji se ujedno smatraju prijenosnicima Q-groznice (Maurin i Raoult, 1999.).

Zbog velikih epidemija Q-groznice od kojih je najvećih razmjera bila ona u Nizozemskoj gdje je oboljelo više od 4000 ljudi, nužni su implementacija, razvoj, standardizacija monitoringa i metoda za detekciju i genotipizaciju bakterije *C. burnetii* (Delsing i sur., 2010.; Sidi-Boumedine, 2010.). Genotipizacijom se stječe uvid u molekularnu epidemiologiju ove opasne i vrlo infektivne bakterije te omogućava utvrđivanje izvora infekcije i donošenje odluke o tome kako reagirati da bi se uklonio izvor zaraze i spriječilo širenje infekcije na ljude i životinje (Arricau-Bouvery i sur., 2006.; Roest i sur. 2011.).

Jedna od metoda za genotipizaciju vrste *C. burnetii* je MLVA (engl. *Multi-Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis* ili *Multi-Locus VNTR Analysis*) koja ima veću moć razlučivanja od drugih metoda, dobiveni podatci lako se razmjenjuju među različitim laboratorijima, a postoje i baze podataka u kojima se nalaze podatci o genotipovima iz cijelog svijeta. Ova je metoda jednostavnija, jeftinija, brža i sigurnija od ostalih jer ne zahtijeva skupu laboratorijsku opremu i izdvajanje same bakterije koja se smije provoditi samo u laboratorijima 3. razine sigurnosti (Arricau-Bouvery i sur., 2006.; Roest i sur.; 2011.).

## 1.1. Cilj rada

DNA bakterije *C. burnetii* izolirana je iz krvi, mlijeka, fecesa, obrisaka rodnice, posteljice, lohija i organa pobačenih fetusa (slezena, jetra i sadržaj želuca) domaćih životinja (koze, ovce, konji, goveda) te krvi ljudi. DNA je izolirana pomoću komercijalnih kitova (DNeasy Blood and Tissue Kit, QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, SAD) ručno prema uputama proizvođača te automatski pomoću uređaja QIAcube (Qiagen, SAD). Identifikacija bakterijske DNA rađena je metodom TRANS ½ PCR kojom se detektira transpozonima slična ponavljajuća regija genoma vrste *C. burnetii* s produktom umnažanja veličine 687 parova baza (Berri i sur., 2000.). Nakon što je potvrđeno da izolirana DNA pripada vrsti *C. burnetii*, izolirana DNA genotipizirana je metodom MLVA (Arricau-Bouvery i sur., 2006.). Dobiveni rezultati obrađeni su metodom UPGMA (engl. *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), a genotipska raznolikost obrađenih uzoraka izračunata je pomoću Hunter-Gaston indeksa raznolikosti (HGDI). Obrađeni podaci objavljeni su internetskoj stranici <http://mlva.u-psud.fr/MLVAnet/> te su uspoređeni s podacima različitih država i regija u svijetu.

### Ciljevi rada:

1. Po prvi put u Hrvatskoj uvesti korištenje metode MLVA za genotipizaciju bakterije *C. burnetii* i tako pridonijeti uvođenju metode MLVA kao standarda za genotipizaciju bakterije *C. burnetii* u svijetu.
2. Utvrditi genetičku raznolikost i rasprostranjenost genotipova dobivenih MLVA metodom po Hrvatskoj i utvrditi moguće izvore zaraze i načine širenja infekcije bakterijom *C. burnetii* između ljudi i različitih vrsta životinja.
3. Usporediti genotipove dobivene u Hrvatskoj s genotipovima u svijetu te ustanoviti da li se radi o podudarnim ili potpuno različitim genotipovima.
4. Procijeniti značenje MLVA metode s obzirom na dijagnostičku i epidemiološku vrijednost u rutinskoj dijagnostici infekcija uzrokovanih bakterijom *C. burnetii*.

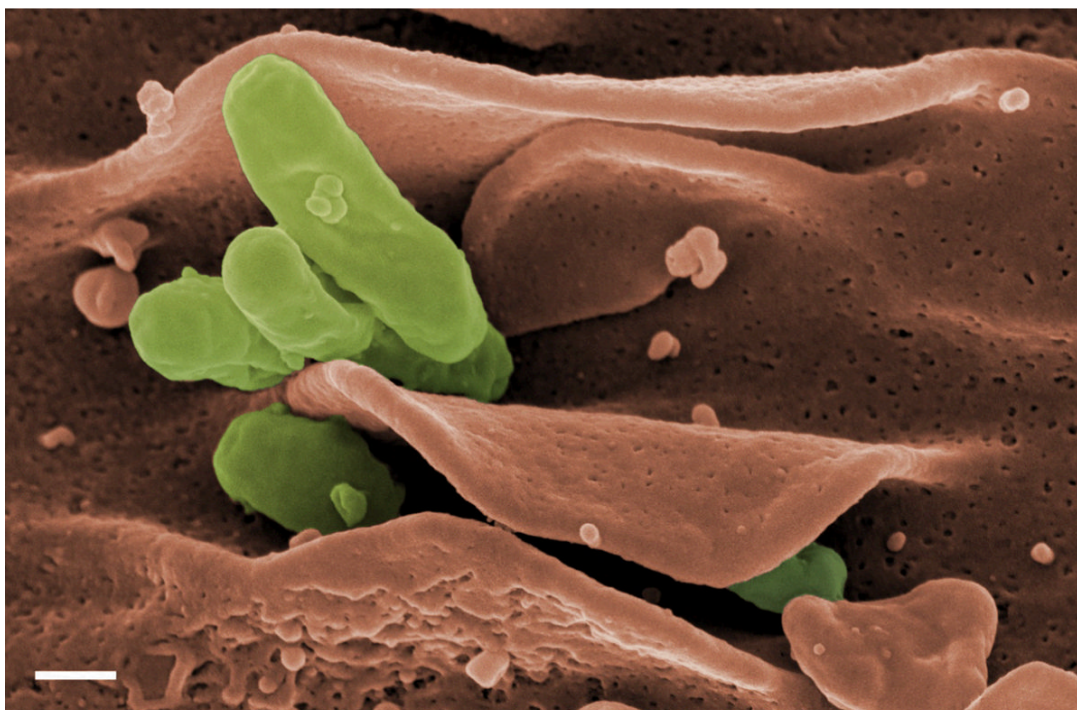
## ***2. LITERATURNI PREGLED***



## 2.1. Povijesni pregled

Q-groznicu prvi je opisao Derrick godine 1935. u Australiji. Radnici u klaonici patili su od visoke temperature u prosjeku 7 do 24 dana, imali su glavobolje, bolove u mišićima i mršavili su. Hemokultura pacijenata je bila negativna, a serum nije sadržavao protutijela za virus influence, tifus ni leptospirozu (Marrie, 2003.). Kako je bolest do tada bila nepoznata, Derrick ju je nazvao „*Query fever*“ (engl. *query* upitnik). Da je uzročnik Q-groznice bakterija dokazano je već godine 1937. Burnet je izdvojio bakteriju iz uzoraka Derrickovih pacijenata, a istu bakteriju Cox je izdvojio iz krpelja nađenih na potoku Nine Mile u Montani u SAD-u (Cutler i sur., 2007.). Po tim je istraživačima bakterija *Coxiella burnetii* dobila ime, a izdvojeni soj vrste *Coxiella burnetii* s potoka Nine Mile postao je referentni soj.

U Europi se Q-groznica prvi put spominje za vrijeme Drugog svjetskog rata. Među američkim vojnicima u Italiji i na Korzici godine 1944. pojavila se epidemija pneumonije, a njemački vojnici u Grčkoj su počeli obolijevati od „balkanske gripe“. Za oba slučaja se kasnije utvrdilo da se radi o Q-groznici. U Hrvatskoj je prve slučajeve Q-groznice dijagnosticirao Mihaljević godine 1948. u Klinici za infektivne bolesti u Zagrebu (Kuzman, 2006.).

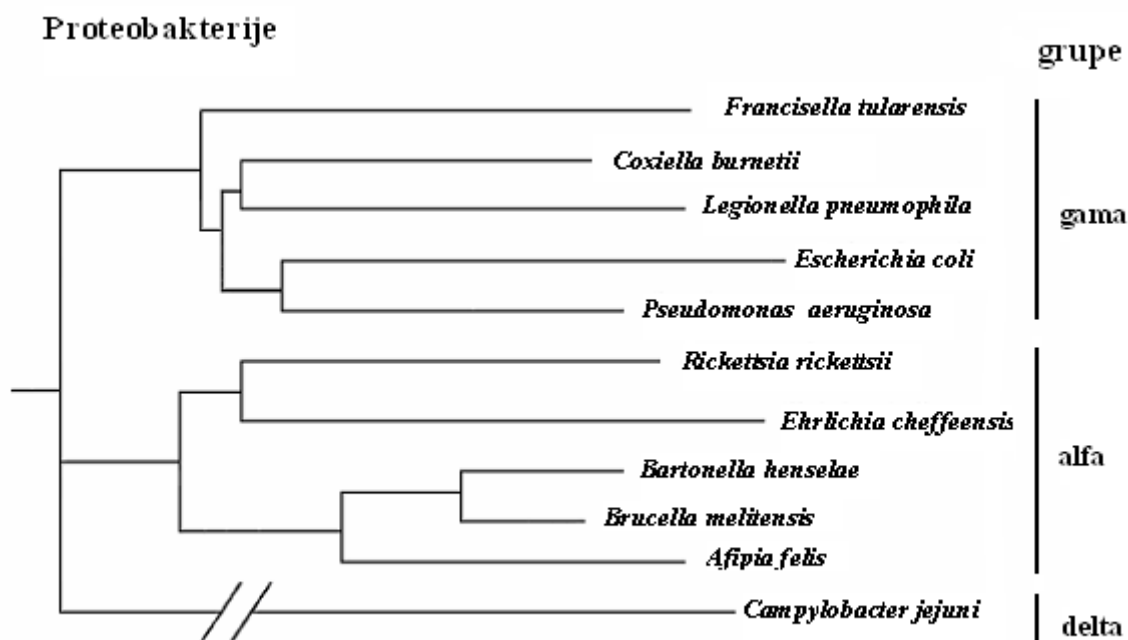


**Slika 1.** Dendritička stanica (obojena smeđe) fagocitira stanice bakterije *C. burnetii* (obojena zeleno). Fotografija dobivena pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa. Mjerilo 0,2  $\mu\text{m}$ . (Preuzeto iz Shannon i Heinzen, 2009.)

## 2.2. Bakteriologija

### 2.2.1. Bakterija *Coxiella burnetii*

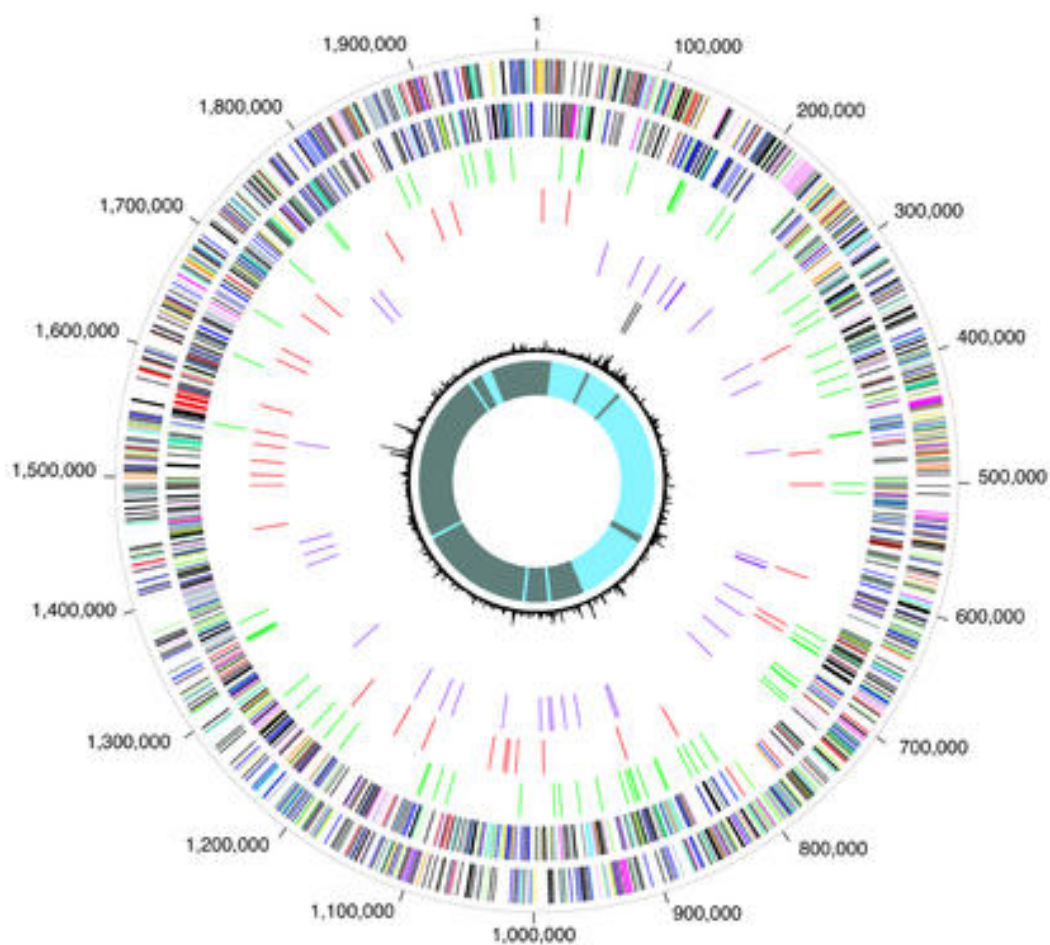
Bakterijska vrsta *Coxiella burnetii* je mala bakterija, 0,2 do 0,4  $\mu\text{m}$  široka i 0,4 do 1  $\mu\text{m}$  dugačka, i obvezatni unutarstanični parazit (Slika 1.). Raste sporo, generacijsko vrijeme iznosi 12 do 20 sati, a dijeli se u fagolizosomu eukariotske stanice (Hackstadt i Williams, 1981.). Iako ima membranu sličnu onoj gram-negativnih bakterija, najčešće se ne može bojati Gramovim postupkom. Klinički uzorci i bakterijska kultura boje se metodom po Gimenezu (Maurin i Raoult, 1999.). Prvotno je bakterija *C. burnetii* bila svrstavana u red *Rickettsiales* i porodicu *Rickettsiaceae* zajedno s rodovima *Rickettsia* i *Rochalimaea* no kasnijim analizama sekvence 16S rRNA svrstana je u  $\gamma$ -proteobakterije (red *Legionellales*), a rodovi *Legionella*, *Francisella* i *Rickettsiella* su joj najbliži srodnici. Bakterijska vrsta *Coxiella burnetii* jedina je vrsta u rodu *Coxiella* (Stein i sur., 1993.). Na Slici 2. prikazano je filogenetsko stablo koje prikazuje srodnost vrste *C. burnetii* i ostalih vrsta Proteobakterija.



**Slika 2.** Filogenetsko stablo koje prikazuje srodnost vrste *C. burnetii* i ostalih vrsta Proteobakterija. Stablo je konstruirano na temelju sekvence gena 16S rRNA metodom *Neighbor-Joining*. (Preuzeto iz Maurin i Raoult, 1999.)

### 2.2.2. Genom bakterije *C. burnetii*

Seshadri i suradnici su godine 2003. objavili sekvencu cijelog genoma vrste *C. burnetii* soja Nine Mile faze I RSA493. Genom čini kružna molekula DNA veličine 1 995 275 parova baza (pb) (Slika 3.) koja sadrži 2134 kodirajuće sekvence od kojih su 719 (33%) hipotetske, odnosno ne podudaraju se s do sada sekvenciranim genima. Udio hipotetskih sekvenci je značajan s obzirom na velik broj trenutno dostupnih sekvenci genoma  $\gamma$ -proteobakterija.



**Slika 3.** Shematski prikaz genoma vrste *C. burnetii* RSA493. Brojevi označavaju broj parova baza, a različite boje označavaju različite kodirajuće i nekodirajuće dijelove genoma. (Preuzeto iz Seshadri i sur., 2003.)

Uz genomsku DNA, u soju Nine Mile faze I RSA493 nalazi se i plazmid veličine 37 393 pb kojeg su sekvencirali Thiele i suradnici godine 1994. i imenovali ga QpH1.

Iako je po načinu života i parazitskim osobinama vrsta *C. burnetii* slična obvezatnim unutarstaničnim patogenim bakterijama iz rodova *Rickettsia*, *Chlamydia* i vrsti *Mycobacterium leprae*, genom bakterije *C. burnetii* od njihovih se genoma razlikuje po prisustvu mobilnih elemenata, opsegu redukcije genoma i metaboličkim svojstvima. Genomi drugih unutarstaničnih parazitskih bakterija nemaju ili imaju malo insercijskih sekvenci (IS) dok vrsta *C. burnetii* ima 29 IS elemenata od čega su 21 kopije iste sekvence IS1111, 5 sekvenci IS30 i 3 sekvence porodice ISAs1. Također sadrži 3 degenerirana gena za transpozaze nepoznatog podrijetla. Sekvence DNA u genima za transpozaze su više od 99% identične što ukazuje na nedavnu pojavu i širenje svakog IS elementa ili homogenizaciju sekvenci usklađenom evolucijom kao što je to slučaj s genima za rRNA. Sekvence IS su razmještene po kromosomu, ne grupiraju se u klastere i nema ih u plazmidu (Seshadri i sur., 2003.).

Analiza genoma vrste *C. burnetii*, otkrila je 83 pseudogena što ukazuje na to da je u tijeku redukcija genoma. Pseudogeni su geni u kojima je došlo do mutacija pomaka u okviru čitanja i/ili točkastih mutacija. Prilikom redukcije genoma dolazi do nakupljanja mutacija u genu dok konačno taj gen ne nestane. Neki geni nestaju jer više nisu potrebni za preživljenje bakterije (npr. promijenila se niša organizma). Redukcija genoma karakteristična je za obvezatne unutarstanične bakterije, a kako je u pseudogenima vrste *C. burnetii* često nađena samo jedna mutacija u pomaku čitanja smatra se da je do mutacija došlo nedavno, odnosno da je redukcija genoma bakterijske vrste *C. burnetii* počela nedavno. Tome u prilog ide činjenica da je velik dio genoma *C. burnetii* kodirajući (89,1%) naspram genoma vrsta kod kojih je došlo do velike redukcije genoma (približno 76% u vrsta *Rickettsia prowazekii* i *M. leprae*). Mutacija pomaka okvira čitanja nađena je i u genu za  $\beta$ -laktamazu što potvrđuje prije opisanu osjetljivost izolata referentnog soja bakterije *C. burnetii* Nine Mile na antibiotike (Seshadri i sur., 2003.).

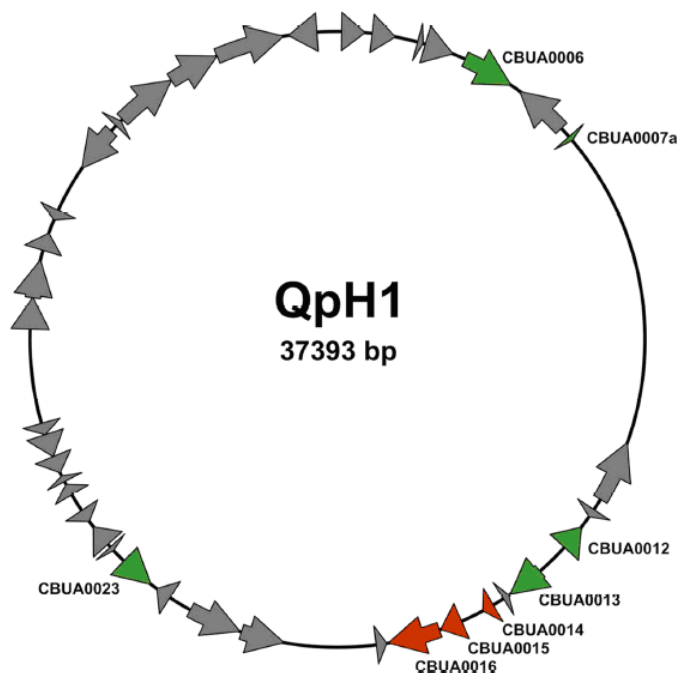
Vrsta *C. burnetii* ima veću sposobnost transporta organskih hranjivih tvari te veću sposobnost biosinteze od drugih unutarstaničnih bakterija pa je stoga i manje ovisna o biosintezi domaćina u kojem parazitira. Također, vrsta *C. burnetii* kodira gene slične genima eukariota koji nisu nađeni u prokariota. Takvi su geni npr. dvije sterol reduktaze (CBU1206 i CBU1158) koje sudjeluju u sintezi kolesterola u eukariota. Odsustvo drugih srodnih gena ukazuje na to da je sinteza kolesterola *de novo* malo vjerojatna. Vjerojatnije je da te sterol reduktaze imaju ulogu u konverziji metabolita uzetih od domaćina te utječu na

organotropizam bakterije *C. burnetii* prema posteljici i tkivima reproduktivnih organa. Neki autori ukazuju na povezanost razine hormona u gravidnih životinja s povećanom prijemljivošću za infekciju (Seshadri i sur., 2003.).

Za ulazak u stanicu domaćina bitna je sposobnost adhezije koju ima ova bakterija. Naime, bakterija *C. burnetii* nema gene koji kodiraju uobičajene strukture odgovorne za adheziju (pili i drugi adhezini) ali ima gene za ankirin. Ankirin je protein koji sudjeluje u adheziji, a pretpostavlja se da sudjeluje i u regulaciji transkripcije u domaćinu. Iako ankirinske domene nisu jedinstvene za vrstu *C. burnetii*, kod nje se javljaju u 13 proteina što je više nego u bilo kojem od do sada sekvenciranih genoma. Relativno visok udio hipotetskih gena mogao bi biti uključen u funkcije bitne za jedinstveni razvojni ciklus i način života vrste *C. burnetii*. Analiza genoma otkriva prisustvo mnogih mobilnih elemenata i pseudogena što ukazuje na promjenjivost genoma te da je redukcija genoma u tijeku. Uzevši u obzir redukciju genoma i uspoređujući sekvencu genoma vrste *C. burnetii* sa sekvencama drugih unutarstaničnih bakterija može se doći do zaključka da je vrsta *C. burnetii* tek nedavno prešla na sadašnji način života (Seshadri i sur., 2003.).

### 2.2.3. Plazmidi

U svakoj bakteriji *C. burnetii* nalazi se jedna vrsta plazmida ili u kromosomu ima ugrađenu sekvencu homolognu plazmidu (Willems i sur., 1997.). Do sada je opisano pet plazmida: QpH1 (Thiele i sur., 1994.), QpRS (Lautenschläger i sur., 2000.), QpDV (Valkova i Kazar, 1995.) i QpDG (Hendrix i sur., 1991.) te jedan plazmid izoliran u Kini (Ning i sur., 1992.). Kasnijim eksperimentima utvrđeno je da su QpDG i QpH1 najvjerojatnije isti plazmid (Jäger i sur., 2002.). Iako se čini da plazmidi uvelike utječu na virulentnost bakterije *C. burnetii* zato što su u svih sojeva prisutne homologne konzervirane sekvence, njihov biološki značaj još uvijek nije razjašnjen. Također, smatralo se da određeni izolati bakterije *C. burnetii* uzrokuju akutni ili kronični oblik Q-groznice ovisno o plazmidu koji imaju, no dokazano je da akutni ili kronični oblik bolesti ovisi o pacijentovom općem stanju i stanju imunskog sustava (Thiele i Willems, 1994.). Na Slici 4. prikazana je mapa plazmida QpH1.



**Slika 4.** Kružna mapa plazmida QpH1 s prikazom lokacija otvorenih okvira čitanja (ORF-ova) specifičnih za plazmid QpH1: CBUA0014 (*cpeC*), CBUA0015 (*cpeD*) i CBUA0016 (*cpeE*) (crvene strelice). Zelenim strelicama označeno je pet ORF-ova zajedničkih svim plazmidima vrste *C. burnetii* i sekvencama nalik plazmidu ugrađenim u kromosom ove bakterije. Proteini s oznakama CpeC, CpeD i CpeE su proteini efektori koji utječu na domaćina pri stvaranju parazitoforme vakuole (PV) u kojoj se bakterija *C. burnetii* dijeli. (Preuzeto iz Voth i sur., 2011.)

#### 2.2.4. Bakterije faze I i faze II

Sojevi bakterije *C. burnetii* izdvojeni iz inficiranih životinja i ljudi virulentne su bakterije koje su u stadiju kojeg nazivamo faza I, a nevirulentni oblik bakterije imaju kada su u fazi II. Ova se faza, odnosno avirulentnost postiže precjepljivanjem bakterija u fazi I *in vitro* u staničnim kulturama ili oplođenim kokošjim jajima. Razlika između bakterija u fazi I i bakterija u fazi II je u građi lipopolisaharida (LPS). Bakterije u fazi I na površini imaju glatki tip LPS-a (LPS faze I) dok bakterije faze II imaju hrapavi tip LPS-a (LPS faze II). LPS lanac faze II je skraćen, nema postrane lance, O-antigen šećere virenozu i dihidrohidroksistreptozu, koji se uvijek nalaze u LPS-u faze I. Do promjene faza I – faza II dolazi zbog delecija u kromosomu. Te delecije obuhvaćaju veliku grupu gena odgovornih za biosintezu LPS-a svrstanih u klaster O-antigena. Klaster uključuje i gene odgovorne za sintezu virenoze. Uloga

LPS-a u patogenosti bakterijske vrste *C. burnetii* još nije u potpunosti razjašnjena, no važan je za imunogenost bakterije a potiče vrlo učinkovit humoralni odgovor. Slična varijacija površinskog antigena glatki - hrapavi javlja se i u enterobakterija, no LPS vrste *C. burnetii* manje je endotoksičan u usporedbi s LPS-om enterobakterija (Honstetter i sur., 2004.).

Bakterije faze I virulentne su zahvaljujući LPS-u koji skriva vanjsku membranu bakterijske stanice. Bakterije faze II su nevirulentne i ne mogu izazvati infekciju u imunokompetentnih domaćina vjerojatno zato jer su podložne razgradnji komplementom, dok su bakterije faze I otporne na djelovanje sustava komplementa. Specifična protutijela za površinske proteine bakterije *C. burnetii* ne vežu se na bakterije faze I no vežu se kad se LPS ukloni kemijskim postupcima. LPS faze I maskira ligande TLR koji su važni za prepoznavanje od strane dendritičnih stanica. Također, LPS inhibira interakciju *C. burnetii* s integrinskim receptorom makrofaga CR3 ( $\alpha M\beta 2$ ) i na taj način izbjegava fagocitozu (Voth i Heinzen, 2007.; Shannon i Heinzen, 2009.).

### 2.2.5. Morfološki oblici i preživljenje bakterije

Vrsta *C. burnetii* ima iznimnu sposobnost preživljavanja izvan stanice te veliku otpornost na djelovanje mehaničkih i kemijskih čimbenika. Otporna je na isušivanje, nizak i visoki pH, kemikalije kao što su amonijev klorid, 0,5% natrijev klorid, UV zrake. Da bi ovu bakteriju inaktivirali formalinom, potrebno ju je držati preko noći u 10%-tnoj otopini formaldehida (Maurin i Raoult, 1999.). Bakterija ostaje živa nakon zagrijavanja pri temperaturi od 63°C tijekom 30 minuta ili 74°C tijekom 15 sekundi. Otporna je i na niske temperature: vijabilna je i nakon dvije godine pohrane pri temperaturi od -20°C. Preživjela je i osmotski šok u vodi pri temperaturi od 45°C nakon kojeg je slijedila sonifikacija pri temperaturi od 4°C te inkubaciji pri temperaturi od 45°C tijekom 3 sata, a na kraju je centrifugirana u gradijentu sahara od 40 do 70% pri temperaturi od 4°C. Za ovakvu izuzetnu otpornost zaslužna je mala stanica nalik spori SCV (engl. *Small Cell Variant*) koja je jedan razvojni stadij bakterije *C. burnetii* (McCaul i Williams, 1981.). McCaul i Williams (1981.) proučavali su morfologiju bakterije *C. burnetii* pomoću transmisijskog elektronskog mikroskopa (TEM) te su predložili koncept bifaznog razvojnog ciklusa. Njihova pretpostavka je bila da metabolički neaktivna stanica SCV biva unesena u eukariotsku stanicu fagocitozom te ostaje u fagolizozomu. Nizak pH u fagolizozomu i možda enzimi i/ili hranjive tvari pokrenu prijelaz SCV u metabolički aktivni oblik LCV (engl. *Large Cell Variant*). Unutar LCV-a McCaul i Williams (1981.) zapazili su i malo polarno tjelešce koje su nazvali SLP (engl. *Spore-Like*



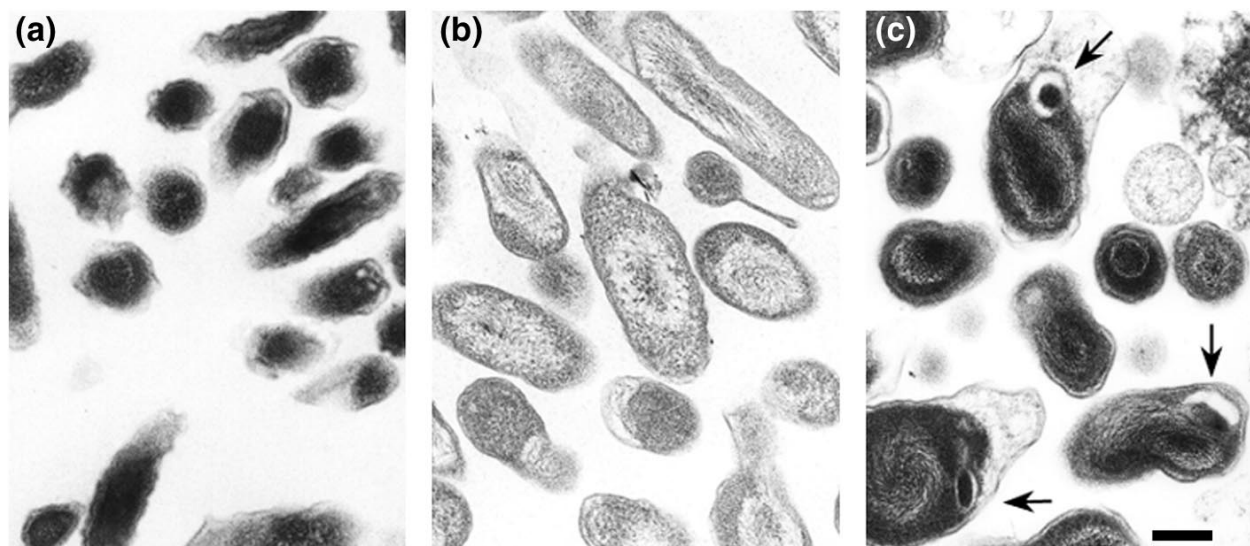
*Particle*) za koje pretpostavljaju da ima svojstva endospore. Također, smatraju da su SCV i/ili SLV oblici koji preživljavaju izvan stanice. SCV i LCV se razlikuju u strukturi, antigenima, metabolizmu, fizičkoj otpornosti i proteinskom sastavu (Tablica 1.). SCV je štapićastog oblika, veličine 0,2 do 0,5  $\mu\text{m}$ , s kondenziranim kromatinom i kompleksnim sustavom zavojitih unutrašnjih membrana koje se mjestimično dodiruju s citoplazmatskom membranom, a periplazmatski prostor se ne može uočiti TEM mikroskopom. Stanice LCV su pleomorfne, veličine 1  $\mu\text{m}$  i više, a kao i gram-negativne bakterije imaju jasno odvojenu vanjsku membranu, periplazmatski prostor i citoplazmatsku membranu. Stanična stijenka im je tanja nego u stanice SCV, a kromatin nije kondenziran (Slika 5.). SCV i LCV stanice se dijele binarnom diobom i infektivne su *in vivo* i *in vitro*. Neki autori uspoređuju LCV s retikularnim tjelešcem, a SCV s elementarnim tjelešcem bakterije *Chlamydia* (Heinzen i sur., 1999.).

**Tablica 1.** Svojstva i različita ekspresija proteina u stanicama SCV i LCV.

	SCV	LCV
<b>Svojstva</b>	0.2–0.5 $\mu\text{m}$ štapićasti oblik kondenzirani kromatin niska metabolička aktivnost <i>in vitro</i> sporadična replikacija inficira stanice u kulturi stabilna u okolišu	>1.0 $\mu\text{m}$ pleomorfna dispergirani kromatin visoka metabolička aktivnost <i>in vitro</i> aktivna replikacija inficira stanice u kulturi osjetljiva
<b>Ekspresija proteina</b>		
ScvA	visoka	niska
Hq1	visoka	niska
OMP34	visoka	niska
P1 (OMP)	umjerena	visoka
35 kDa (EF-Ts)	umjerena	visoka
45 kDa (EF-Tu)	niska	visoka

SCV – mala stanica nalik spori (engl. *Small Cell Variant*); LCV – metabolički aktivna velika stanica (engl. *Large Cell Variant*); OMP – protein vanjske membrane; EP – elongacijski faktor. (Preuzeto iz Heinzen i sur., 1999.)

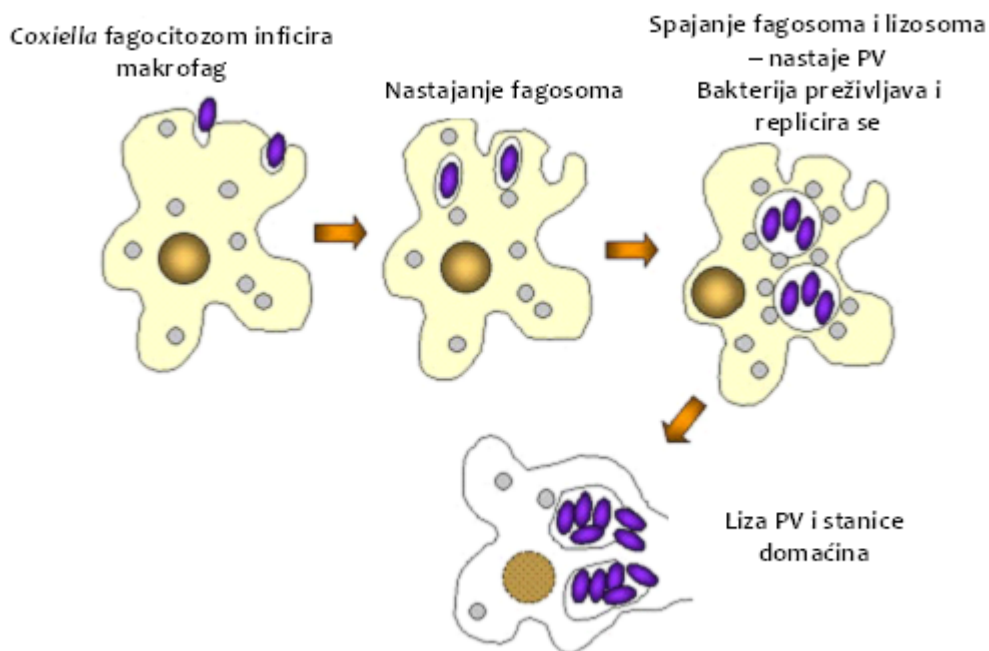




**Slika 5.** Slike dobivene elektronskim mikroskopom. (a) stanice SCV (mala stanica nalik spori (engl. *Small Cell Variant*)) s kondenziranim kromatinom; (b) stanice LCV (metabolički aktivna velika stanica (engl. *Large Cell Variant*)) s dispergiranim kromatinom; (c) stanice LCV s pričvršćenim stanicama SLP (polarno tjelešce (engl. *Spore-Like Particle*)). Stanice SLP označene su strelicama. Mjerilo 0,2 µm. (Preuzeto iz Heinzen i sur., 1999.)

#### 2.2.6. Ulazak u eukariotsku stanicu

Bakterija *C. burnetii* je jedinstvena među unutarstaničnim bakterijama jer se unutar stanice domaćina nalazi u parazitoformnoj vakuoli (engl. *parasitophorous vacuole*, PV) koja ima karakteristike sekundarnog lizosoma. *In vitro*, bakterija *C. burnetii* ulazi pasivno (i vijabilne i nevijabilne bakterije ulaze) endocitozom i repliciraju se u različitim stanicama; epitelnim, fibroblastima i staničnim linijama nalik makrofagima (Baca i sur., 1993.). Ben Amara i suradnici (2010.) radili su istraživanja kojima su po prvi put dokazali sposobnost inficiranja i diobe bakterije *C. burnetii* u trofoblastima. *In vivo*, ova bakterija prvo ulazi u alveolarne makrofage, a kasnije se može proširiti po raznim tkivima. Nastali fagosom se spaja s lizosomom i sazrijevanjem nastaje PV. U PV se pH snižava na 4,8 čime se aktivira metabolizam bakterije i ona se počinje dijeliti usprkos djelovanju hidrolaza i defenzina koji su inače pogubni za bakterije (Slika 6.) (Hackstadt i Williams, 1981.).



**Slika 6.** Infekcija makrofaga bakterijom *C. burnetii*. (Preuzeto s internetske stranice <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:Rick2.jpg> i prevedeno 5.8.2012.)

Zrela PV koja sadrži bakteriju *C. burnetii* zauzima skoro cijelu citoplazmu stanice domaćina, a volumen je veći od volumena stanice. Pretpostavlja se da je PV tako velika zato da bi se otrovni spojevi koji se otpuštaju ili nastaju u fagolizosomu razrijedili i na taj način smanjio njihov toksični učinak na bakteriju. Tijekom diobe inficirane stanice, cijela PV ostaje u jednoj stanici. Membrana PV-a ima isti sastav kolesterola kao membrana stanice domaćina. Takve velike količine kolesterola sintetizira sama stanica domaćina. U kasnoj fazi infekcije s vrstom *C. burnetii* sinteza kolesterola u stanici domaćina povisi se za 73% (Voth i Heinzen, 2007.).

Barry i suradnici (2010.) smatraju da je pretpostavka da je bakterija *C. burnetii* smještena u PV netočna i da ona ostaje u kasnom fagosomu monocita i makrofaga, a istovremeno sprječava stvaranje fagolizosoma. Smatraju da u istraživanjima kojima je utvrđeno da se bakterija *C. burnetii* umaža u PV nije korišteno dovoljno markera za određivanje odjeljka u stanici u kojem se bakterija nalazi te da su pokusi rađeni s nevirulentnim sojevima vrste *C. burnetii* što je istraživače navelo na pogrešne zaključke.

### 2.2.7. Apoptoza inficiranih stanica

Apoptoza inficiranih stanica važan je obrambeni mehanizam domaćina kojim se ograničava širenje bakterijske infekcije. Istraživanja Votha i suradnika (2007.) pokazala su da bakterija *C. burnetii* modulira apoptotski put kako bi spriječila smrt stanice domaćina i tako si osigurava stabilnu unutarstaničnu okolinu pogodnu za rast i umnažanje.

Istraživanja Zhanga i suradnika (2012.) dala su potpuno suprotne rezultate. Po njima, vrsta *C. burnetii* dovodi do apoptoze stanice domaćina u ranom stadiju infekcije što bakteriji omogućava širenje po organizmu domaćina i uspostavljanje perzistentne infekcije. Rezultati različitih istraživanja su oprečni, neki autori tvrde da vrsta *C. burnetii* potiče, a drugi da sprječava apoptozu inficirane stanice. Zhang i suradnici (2012.) stoga zaključuju da je osjetljivost stanice na apoptozu induciranu unutarstaničnim patogenom različita ovisno o tipu stanice, stadiju razvoja i različitoj ekspresiji staničnih površinskih receptora.

## 2.3. Epidemiologija

### 2.3.1. Načini prijenosa

Inhalacija kontaminiranog aerosola najčešći je način infekcije u ljudi i životinja (Tissot-Dupont i sur., 2004.). U pokusnim uvjetima, inhalacija samo jedne bakterijske stanice dovoljna je za infekciju u ljudi (Tigertt i sur., 1961.). Domaće životinje, koze, ovce i goveda, glavni su rezervoar bakterije *C. burnetii* i najčešći izvor infekcije za ljude. Bakterija *C. burnetii* u okoliš dospijeva iz mlijeka, fecesa, urina i sline inficiranih životinja. Najviše bakterija u okoliš dospijeva prilikom poroda i/ili pobačaja u domaćih životinja (vaginalni sekret, posteljica i amnionska tekućina) (Vaidya i sur., 2010.). Posteljicom se izluči čak do  $10^9$  bakterija po gramu tkiva (Arricau-Bouvery i Rodolakis, 2005.). Neki autori opisuju sezonske varijacije u javljanju infekcija u ljudi. Najveći broj oboljelih je u proljeće i rano ljetno što se povezuje sa sezonom janjenja i striženjem ovaca (Tissot-Dupont i sur., 1999.). Infekcije ljudi nisu uvijek posljedica izravnog doticaja sa zaraženim životinjama već se mogu zaraziti posredno kontaminiranom vunom, korištenjem kontaminiranog gnojiva u vrtovima i kontaminiranom odjećom (Arricau-Bouvery i Rodolakis, 2005.). Česti su primjeri velikog broja oboljelih ljudi na područjima izloženim vjetru koji donosi bakterije s mjesta na kojim pasu zaražene domaće životinje (Tissot-Dupont i sur., 1999.), a nerijetko oboljevaju ljudi koji žive uz puteve kojima životinje idu na ispašu (Dupuis i sur., 1987.). Zbog načina prijenosa ove bakterije, infekciji su najviše podložni veterinari, laboratorijski djelatnici, radnici u klaonicama, štavionicama i obradi vune, uzgajivači stoke te ljudi koji žive u blizini pašnjaka (Arricau-Bouvery i Rodolakis, 2005.; Porter i sur., 2011a.).

Konzumiranje kontaminiranog mlijeka i mliječnih proizvoda rjeđi je način infekcije. Pijenje kontaminiranog mlijeka u volontera očitovalo se serokonverzijom bez vidljivih kliničkih znakova bolesti (Benson i sur., 1963.) dok je konzumiranje sira dovelo do pojave bolesti (Fishbein i Raoult, 1992.). Zbog toga se preporuča pasteurizacija (72°C/15 sekundi) ili sterilizacija mlijeka iz inficiranih stada (Arricau-Bouvery i Rodolakis, 2005.). Moguće je inficirati se konzumacijom sirovih jaja inficiranih kokoši (Stein i Raoult, 1999.). Hatchette i suradnici (2001.) su u svom radu, između ostalog, proučavali pušenje duhana kao rizika za infekciju vrstom *C. burnetii* te ustanovili da je rizik od infekcije veći u pušača. Do infekcije najvjerojatnije dolazi zbog diranja cigareta kontaminiranim rukama što dovodi do ingestije bakterije *C. burnetii*.

Prijenos infekcije s čovjeka na čovjeka je rijedak no opisani su slučajevi prijenosa uzročnika Q-groznice s majke na dijete u trudnoći i prijenosa na osobe prisutne tijekom poroda (Stein i Raoult, 1998.). Infekcija se može prenijeti spolnim odnosom (Milazzo i sur., 2001.), a opisan je i slučaj infekcije prilikom autopsije (Gerth i sur., 1982.). U literaturi su opisani slučajevi prijenosa uzročnika Q-groznice transfuzijom krvi te mogući prijenos transplantacijom koštane srži imunokompromitiranom pacijentu. U životinja je opisan prijenos uzročnika Q-groznice transplantacijom jetre, timusa i limfnih čvorova (Van Wijk i sur., 2011).

### 2.3.2. Prijenos sa životinja

Pinsky i suradnici (1991.) opisali su pojavu Q-groznice u jednoj obitelji u SAD gdje je izvor zaraze mačka koja se macila, a Stein i Raoult (1999.) opisuju francusku obitelj koja se zarazila udisanjem aerosola kontaminiranog fecesom golubova koji su bili inficirani ugrizom krpelja. Buhariwalla i suradnici (1996.) opisuju slučaj pojave Q-groznice u obitelji čija je kuja dobila mlade. Simptomi infekcije pojavili su se kod troje ljudi 8 – 12 dana nakon štenjenja, a svi su izlječeni primjenom antibiotika. Sva četiri psića su uginula, tri odmah nakon štenjenja, a jedan nešto kasnije unutar 24 sata. Psi se mogu zaraziti jedenjem posteljice zaraženih životinja, pijenjem zaraženog mlijeka, udisanjem kontaminiranog aerosola ili ugrizom krpelja. Kruszevska i Tylewska-Wierbanowska (1993.; 1997.) dokazale su bakteriju *C. burnetii* u reproduktivnim organima mužjaka laboratorijskih životinja i goveda, te smatraju da je prijenos spolnim putem jedan od načina širenja bolesti među životinjama.

U mnogih životinja ubrzo nakon infekcije javlja se prolazna bakterijemija. U tom se periodu krpelj koji siše krv takvoj životinji može inficirati pijenjem krvi. Infekcija vrstom *C. burnetii* dokazana je u više od 40 vrsta krpelja. Bakterija *C. burnetii* umnaža se u stanicama crijeva i želuca krpelja a u velikim količinama se izlučuje fecesom na kožu životinja čijom krvlju se krpelj hrani. Ako bakterija inficira reproduktivni sustav krpelja, ona će se prenositi i na potomke krpelja. Smatra se da krpelji nisu esencijalni za prijenos infekcije u domaćih životinja no vjerojatno imaju značajnu ulogu u prijenosu infekcije među divljim životinjama, poglavito zečevima, glodavcima i divljim pticama (Maurin i Raoult, 1999.). Do sada nije dokazano da krpelji prenose infekciju na ljude ugrizom, ali opisan je slučaj infekcije u čovjeka koji je prstima prignječio krpelja (Angelakis i Raoult, 2010.; Stein i Raoult, 1999.).

Bakterija *C. burnetii* je izdvojena i iz drugih artropoda kao što su grinje, uši i muhe (Maurin i Raoult, 1999.).

Osim koza, ovaca i goveda, vrsta *C. burnetii* izdvojena je iz drugih domaćih i divljih životinja kao što su konji, zečevi, svinje, deve, štakori i miševi. Smatra se da su štakori najvažniji rezervoari vrste *C. burnetii* preko kojih se inficiraju domaće životinje, naročito mačke jer love štakore. Ptice također mogu biti inficirane, a vrsta *C. burnetii* izdvojena je iz golubova, pilića, pataka, gusaka i pura. Specifična protutijela za bakteriju *C. burnetii* dokazana su u zmija i kornjača u Indiji no sama bakterija nije izdvojena iz tih životinja (Maurin i Raoult, 1999.).

### **2.3.3. Geografska rasprostranjenost**

Bolest koju uzrokuje ova virulentna bakterijska vrsta - Q-groznica proširena je po cijelom svijetu (Maurin i Raoult, 1999.) pa čak i arktičkom području (Koch i sur., 2010.). Nedavno je i na Novom Zelandu (Greenslade et al., 2003.) dokazana Q-groznica premda se dugo smatralo da je tamo nema (Hilbink i sur., 1993.). U Tablici 2. navedene su značajnije epidemije Q-groznice opisane između godine 1999. i 2003.

**Tablica 2.** Značajnije epidemije Q-groznice opisane između 1999. i 2003. godine.

Godina Objav.	Godina Izbijanja	Zemlja	Izvor	Broj slučajeva	Glavni klinički znakovi	Dijagnostika
2004	2003	Italija	ovce	133	povišena temperatura, kašalj	IF
2003	2002	Francuska	ovce	88	povišena temperatura, glavobolja, PRT	IF
2003	2000	Francuska	kozje gnojivo	10	povišena temperatura, mijalgija, znojenje, glavobolja	IF
2003	2000	Francuska	ovčje gnojivo	5	povišena temperatura, glavobolja, PRT	IF
2003	2000	Australija	nepoznat	16	nije opisano	RVK
2003	1997	Bosna	ovce	26	umor, glavobolja, povišena temperatura	serologija
2003	nepoznato	Japan	psi i mačke	2	bez simptoma	IF i PCR
2002	1996	Francuska	ovce	29	povišena temperatura, mijalgija, PRT	IF
2002	nepoznato	Japan	put u Australiju	3	povišena temperatura, umor, PRT	IF i PCR
2001	1999	Izrael	nepoznat (radnici u kuhinji)	16	povišena temperatura, glavobolja, hepatitis, pneumonija	ELISA
2001	1998	Australija	ovce (radnici u klaonici)	33	?	serologija
2001	1996-2000	Francuska Gvajana	divlje životinje	132	pneumopatija	IF
2001	1999	Newfoundland (Kanada)	koze	60	povišena temperatura, glavobolja, PRT	IF
2000	nepoznato	Nizozemska	odmor u Francuskoj	4	pneumonija, hepatitis	serologija
2000	1999	Njemačka	ovčje gnojivo i izmet	?	?	?
2000	nepoznato	Kenija	koze	4	povišena temperatura, glavobolja, pneumonija	IF
1999	1990-1995	Francuska	ovce	289	povišena temperatura, glavobolja, PRT	IF
1999	1987-1988	Italija	ovce	235	simptomi slični gripi	?

Objav. - godina objavljivanja

IF - imunofluorescencija

PRT – povišena razina transaminaza

RVK – reakcija vezanja komplementa

(Preuzeto iz Arricau-Bouvery i Rodolakis, 2005.)

Kim i suradnici (2005.) su u periodu od siječnja 2001. do prosinca 2003. godine metodom TRANS-PCR (Hoover i sur., 1992.) testirali somatske stanice izdvojene iz skupnih uzoraka mlijeka dostavljenih s 316 farmi mliječnih krava, a zatim su metodom real-time PCR pratili količinu bakterija izlučenih mlijekom inficiranih krava. Za metodu real-time PCR sami su dizajnirali početnice i probe. Utvrdili su da je više od 90 % farmi mliječnih krava u SAD-u inficirano bakterijom *C. burnetii* te da se u uzorcima mlijeka luči 100 bakterija po mililitru. Kako broj bakterijskih stanica vrste *C. burnetii* izlučenih u mlijeku nije varirao na dnevnoj bazi tijekom 7 dana ni tjedno tijekom 4 tjedna, zaključili su da se radi o kroničnoj infekciji. Također, u različitim državama SAD-a postotak inficiranih farmi približno je jednak i ne mijenja se s vremenom pa pretpostavljaju da je infekcija prisutna u cijelom SAD-u.

U Danskoj 2005. godine Q-groznica je bila praktički nepoznata bolest. No uvođenjem novih, osjetljivijih dijagnostičkih metoda za detekciju bakterije *C. burnetii*, otkriven je velik broj seropozitivnih goveda što je izazvalo zabrinutost ljudi koji su u doticaju sa stokom. U naredne dvije godine drastično se povećao broj ljudi koji su se testirali na Q-groznicu pa je od 1613 testiranih ljudi 177 bilo pozitivno. Od 127 pozitivnih, 31% je testirano zbog simptoma koji odgovaraju simptomima Q-groznice, a moguće je da su bili izloženi infekciji vrstom *C. burnetii*, dok 64% pozitivnih nije imalo simptome, ali bili su u kontaktu sa životinjama inficiranim bakterijom *C. burnetii*. Bacci i suradnici (2012.) zaključili su da je povećan broj zahtjeva za testiranje na Q-groznicu tijekom 2006. i 2007. godine rezultat povećane informiranosti ljudi o Q-groznici, a ne rezultat veće učestalosti Q-groznice. Također smatraju da je u Danskoj Q-groznica endemska bolest.

U godini 2008. i 2009. u njemačkoj pokrajini Baden-Württemberg zabilježena su dva uzastopna izbijanja epidemije Q-groznice. Godine 2008. oboljela je 41 osoba iz jedne lokalne zajednice. Usprkos poduzimanju mjera prevencije i kontrole godine 2009. pojavilo se novih 29 slučajeva Q-groznice u ljudi. Smatra se da je godine 2008. izvor infekcije bilo stado od 550 ovaca koje je prolazilo kraj sela oboljelih ljudi. Izvor infekcije godine 2009. nije utvrđen no smatra se da su to livade kontaminirane inficiranim posteljicama i izlučevinama prilikom poroda ovaca (Hilbert i sur., 2011.).

U svibnju godine 2007. u gradu Florac na jugu Francuske javilo se pet pacijenata sa simptomima koji odgovaraju simptomima Q-groznice. Pacijenti su bili zaposlenici poljoprivrednog edukacijskog centra. Provedeno je istraživanje da bi se utvrdio izvor infekcije i faktori rizika te uvele mjere kontrole. Ljudi sa simptomima Q-groznice koji su živjeli, radili ili posjećivali Florac između 1. travnja i 30. lipnja 2007. godine serološki su testirani. Veterinari su testirali lokalna stada serološkim metodama i PCR-om. Ukupno je testirano 122



ljudi. U 18 je dokazan akutni stadij Q-groznice od kojih je 12 bilo iz edukacijskog centra. Od 26 testiranih lokalnih stada ovaca i koza, 11 je bilo pozitivno na Q-groznicu. Smatra se da je izvor infekcije za ljude bila bakterija *C. burnetii* koja je iz inficiranih stada prašinom dospjela u zrak i širenjem aerosolom uzrokovala Q-groznicu (King i sur., 2011.).

U urbanom području Izraela, godine 2005. javila su se 144 slučaja Q-groznice kod zaposlenika i učenika jednog internata. Infekcija se najvjerojatnije proširila sustavom za klimatizaciju (Amitai i sur., 2010.).

U Turskoj je Q-groznica prijavljena u kasnim 1940-im godinama i endemična je u ljudi i životinja. Nakon izbijanja Q-groznice 2002. godine u regiji Samsun Tekkeköy (sjeverna Turska), Gozalan i suradnici (2010.) napravili su istraživanje u kojem su nasumično testirali 407 ljudi koji nisu imali specifične simptome. U 33-oje ljudi utvrđeno je da su preboljeli Q-groznicu, a 22-oje je imalo akutnu ili kroničnu Q-groznicu. Činjenica da je čak 13,5% ljudi bez kliničkih znakova bolesti bilo seropozitivno ukazala je na to da je Q-groznica prevalentna i često asimptomatska bolest u toj regiji. Seroprevalencija je bila značajno viša u ljudi starijih od 30 godina, lovaca i radnika u klaonicama.

Q-groznica u Sloveniji prvi je put opisana godine 1954. Godine 1985. opisana su dva slučaja izbijanja Q-groznice. U jednom, izvor infekcije bilo je stado ovaca, dok su u drugom slučaju oboljeli radnici u štavionici kože. Godine 1991. i 1992. Q-groznica se javila zbog kontakta ljudi s inficiranim stadima ovaca. Od 1996. do 2005. godine u Sloveniji se javlja 0 do 5 slučajeva Q-groznice godišnje. Grilc i suradnici (2007.) opisuju pojavu Q-groznice u 33-oje učenika i 2 učitelja srednje veterinarske škole koji su bili na terenskoj nastavi na jednoj farmi ovaca u Sloveniji 2007. godine.

U Bugarskoj u Botevgradu (zapadna Bugarska) godine 2004. prijavljeno je 220 slučajeva Q-groznice u ljudi. To je najveća epidemija Q-groznice posljednjih 20-ak godina u Bugarskoj. Smatra se da su izvor infekcije bila zaražena stada ovaca i koza (Panaiotov i sur., 2009.).

Klinički znakovi Q-groznice u Japanu slični su onima u ostatku svijeta. No u Japanu je veća učestalost Q-groznice u djece nego drugdje. Mačke se smatraju čestim izvorom infekcije za ljude. Od 1999. godine u Japanu se godišnje javlja 7 do 46 slučajeva Q-groznice (Porter i sur., 2011b).

U Nizozemskoj se godine 2007. javio velik broj ljudi oboljelih od Q-groznice. U sljedećim godinama broj oboljelih bio je sve veći tako da je do 2010. godine broj prijavljenih slučajeva premašio 4000. U 2006. godini rađeno je istraživanje kojim je utvrđeno da je udio ljudi seropozitivnih na Q-groznicu nizak (2,4%) što je ukazalo na to da se epidemija Q-

groznice javila 2007. godine i da velik broj seropozitivnih ljudi nije rezultat veće svjesnosti liječnika o prisustvu Q-groznice. Do 2007. godine broj oboljelih ljudi u Nizozemskoj bio je oko 20-tak godišnje. Izbijanje Q-groznice u ljudi povezano je s farmama koza koje su bile zaražene bakterijom *C. burneti*. Broj farmi, kojih je godine 1985. bilo oko 5000, popeo se na 375 000 u 2009. godini. Također, farme su postale velike, sa po 1000 životinja na jednoj farmi. Za razliku od drugih zemalja s manjim brojem oboljelih ljudi u epidemijama Q-groznice, u Nizozemskoj se farme obično nalaze u gusto naseljenim područjima. Tek u 2008. godini poduzete su ozbiljnije mjere za suzbijanje Q-groznice u Nizozemskoj. Zabranjeno je korištenje gnojiva s inficiranih farmi te je naređeno cijepljenje svih negravidnih koza na zahvaćenom području. Cijepljenje ne eliminira bolest, ali smanjuje izlučivanje bakterija u inficiranim stadima čime se ujedno smanjuje i kontaminacija okoliša. Nakon daljnjeg povećanja broja oboljelih u 2009. godini te više smrtnih slučajeva, poduzete su drastičnije mjere. Skupni uzorci mlijeka s farmi testirani su na prisutnost bakterije *C. burnetii* metodom PCR pa je s 88 farmi uklonjeno više od 50000 koza. Također, na tim je farmama zabranjen rasplod. Mjere su se počele provoditi u prosincu 2009. godine. Stanovnici koji su živjeli u radijusu od 5 kilometara upozoreni su na prisustvo Q-groznice, a objavljen je i popis farmi na kojima je dokazana bolest. Preporučeno je cijepljenje ljudi sa srčanim i vaskularnim bolestima, te se počelo provoditi testiranje darovane krvi. Godine 2010. prijavljeno je manje oboljelih u odnosu na godinu 2009. pa su zaključili da su poduzete mjere imale učinka na smanjenje prijenos Q-groznice na ljude (Delsing i sur., 2010.).

Pedersen i Hansen (2008.) u svom radu predstavljaju računalni program pomoću kojeg se može predvidjeti smjer širenja zrakom prenosivih patogenih mikroba. Takav program bio bi koristan za procjene posljedica širenja patogenih mikroba u slučaju njihovog nenamjernog ispuštanja iz industrijskih postrojenja, širenja patogenih mikroba s inficiranih ljudi i životinja pa i u slučajevima namjernog ispuštanja u terorističkim napadima. Procjene širenja omogućile bi brz odgovor službi za kontrolu širenja patogenih mikroba dok se bez takvih procjena mjere suzbijanja i kontrole poduzimaju tek nakon pojave prvih slučajeva bolesti te skupljanja uzoraka i laboratorijskih pretraga.

Schimmer i suradnici (2010.) upotrijebili su generički geografski informacijski sustav (GIS) za utvrđivanje izvora infekcije u pojavi Q-groznice u Nizozemskoj 2008. godine. Analize pomoću GIS-a su u skladu s njihovom hipotezom da je jedna farma mliječnih koza izvor bolesti u ljudi premda je broj oboljelih (više od 4000) upućivao na više izvora bolesti. Također, sustav je dao procjenu rizika od oboljevanja koji je puno veći u ljudi koji žive unutar radijusa 2 km od inficirane farme nego u onih koji su više od 5 km udaljeni od farme.

### 2.3.4. Q-groznica u Hrvatskoj

U Hrvatskoj je u razdoblju od 1997. do 2010. godišnje prijavljivano 20 do 50 slučajeva oboljelih od Q-groznice, osim 2003. i 2004. godine kad je prijavljeno 206, odnosno 104 slučaja oboljelih od Q-groznice (Tablica 3.). Broj epidemija i broj oboljelih u epidemijama u razdoblju od 2007. do 2010. godine prikazan je u Tablici 4.

**Tablica 3.** Broj oboljelih od Q-groznice od 1997. do 2010. godine.

godina	1997.	1998.	1999.	2000.	2001.	2002.	2003.	2004.	2005.	2006.	2007.	2008.	2009.	2010.
broj oboljelih	51	26	20	26	51	23	206	104	40	28	43	41	22	24

(Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2010.; 2011.)

**Tablica 4.** Broj epidemija Q-groznice i broj oboljelih u epidemijama od 2007. do 2010. godine.

godina	broj epidemija	broj oboljelih
2010.	1	15
2009.	0	0
2008.	2	15
2007.	2	5

(Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2011.; Aleraj, 2008.; 2009.; 2010.)

Mulić i suradnici (2010.) opisali su epidemiološke osobitosti Q-groznice u Hrvatskoj u razdoblju prije i poslije Domovinskog rata. Infekcije vrstom *C. burnetii* proširene su po cijeloj Hrvatskoj a Q-groznica u ljudi javlja se u gotovo svim županijama. U periodu od 1983. do 1992. u Hrvatskoj je zabilježeno ukupno 1053 oboljelih od Q-groznice od čega je 171 oboljela osoba (16,2%) živjela na otocima i priobalju. U tom razdoblju izbijanje i širenje Q-groznice pojavilo se osam puta na različitim mjestima. Najveći broj oboljelih bio je u epidemiji Q-groznice godine 1983. kada je oboljelo više od 300 ljudi. U razdoblju nakon Domovinskog rata (1995.–2008.) epidemija Q-groznice javila se sedam puta, a ukupno su oboljele 654 osobe od čega 59,9% (392) na otocima i priobalju. Osim pada incidencije, došlo je do promjene zemljopisne distribucije bolesti: prije rata područje s najvišim morbiditetom bila je Sisačko-moslavačka županija jer su, za vrijeme bivše zajedničke države, ovce iz Bosne i

Hercegovine, među kojima je bilo velik broj inficiranih uzročnikom Q-groznice, nesmetano prelazile granicu radi ispaše na granici te županije s Bosnom i Hercegovinom. Poslije rata situacija se promijenila. Županija s najvišim brojem oboljelih je Splitsko-dalmatinska, jer se u poslijeratnom razdoblju zimska ilegalna ispaša ovaca iz Bosne i Hercegovine odvija na području ove županije. I prije i poslije rata u Hrvatskoj najviše oboljevaju muškarci između 20 i 39 godina što se povezuje s tim da su to ljudi u radnim godinama i da su zbog svojih zanimanja muškarci češće izloženi Q-groznici nego žene. Najmanji broj slučajeva se javlja zimi, a najviše u proljeće i to u travnju, svibnju i lipnju zbog janjenja kada se ljudi inficiraju udisanjem bakterija koje iz posteljice i amnionske tekućine dopijevaju u okoliš a šire se zrakom. Smrtnost izazvana Q-groznicom u svijetu je niska (1-2,4%). U Hrvatskoj je u promatranim periodima oboljelo ukupno 1706 ljudi a nije zabilježen ni jedan smrtni slučaj.

Vilibić-Čavlek i suradnici (2012.) proučavali su seroprevalenciju Q-groznice u različitim regijama Hrvatske. U periodu od 2008. do 2010. godine, 552 seruma pacijenata koji su imali vrućicu i kašalj, u dobi između jedne i 88 godina, testirani su na prisustvo protutijela na bakteriju *C. burnetii* imunofluorescencijom. U 27,5% seruma dokazana su IgG protutijela. Pozitivni serumi potjecali su od pacijenata iz svih dijelova Hrvatske no udio pozitivnih seruma značajno se razlikovao od regije do regije (od 21,5% do 41,2%). Muškarci su češće bili seropozitivni (31,6%) od žena (22,2%). Uzevši u obzir starost pacijenata, udio seropozitivnih pacijenata raste, od 6,7% u djece mlađe od 10 godina do 39,2% u pacijenata u dobi između 40 i 49 godina. U pacijenata starijih od 50 godina postotak seropozitivnih osoba je stabilan. Pacijenti iz seoskih područja Hrvatske češće su bili seropozitivni od pacijenata iz gradskih dijelova. Akutni oblik Q-groznice potvrđen je u 5,8% pacijenata. Q-groznica javljala se tijekom cijele godine no većina slučajeva ipak je bila tijekom ljetnih mjeseci.

Medić i suradnici (2005.) opisuju epidemiju Q-groznice u jednoj tvornici u blizini Zadra u ožujku 2004. godine. Epidemiju povezuju s puhanjem jake bure u tom području dva do tri tjedna prije izbijanja Q-groznice. Od 110 radnika u tvornici oboljelo je 14 koji su radili uz prozore na sjevernom dijelu tvornice ili uz otvore ventilacije gdje je ulazio infektivni aerosol (zrak kontaminiran bakterijom *C. burnetii*) nošen sjevernim vjetrom s okolnih pašnjaka.

U Hrvatskoj je Q-groznica oduvijek bila prepoznavana, odnosno opisivana kao atipična pneumonija. Zekanović i suradnici 2010. godine opisuju prvi slučaj endokarditisa uzrokovanog infekcijom bakterijom *C. burnetii* u Hrvatskoj. Riječ je o 70-godišnjem pacijentu iz Dalmacije kod kojega je nakon dugotrajne vrućice dokazan endokarditis koji je nastao kao posljedica kroničnog oblika Q-groznice. Liječenje je započeto kao u „kultura-

negativnih endokarditisa bez kliničkog odgovora“. Nakon seroloških pretraga u kojima je dokazan visok titar IgG i IgA na fazu I bakterije *C. burnetii* liječenje je promijenjeno a primijenjeni su doksiciklin i ciprofloksacin koji su doveli do ozdravljenja.

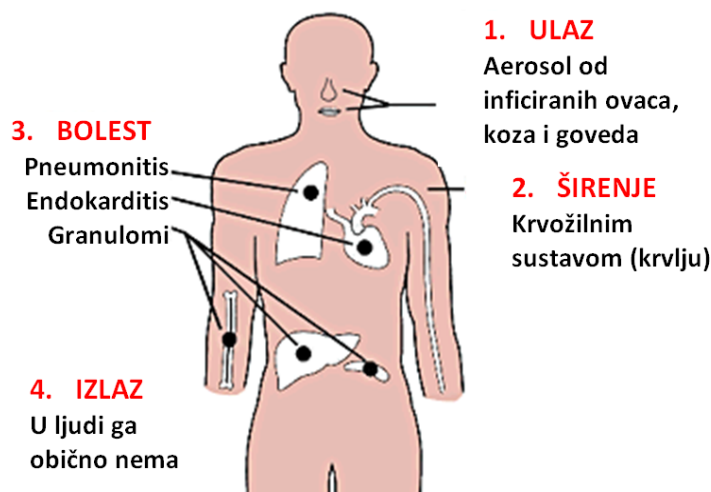
U dnevnom listu „Vjesnik“ od 17. travnja 2008. godine objavljen je članak u kojem se navodi da se u Opću bolnicu Pula prethodna dva dana javilo ukupno šest osoba sa sumnjom da su zaraženi, odnosno da boluju od Q-groznice. Sve osobe imale su iste simptome: glavobolju, povišenu temperaturu, bolove u mišićima i opću slabost; pet oboljelih osoba liječilo se ambulantno, a jedna je osoba smještena na jedinici za intenzivnu njegu Pulske bolnice. Sve osobe igrale su golf na golf-vježbalištu u Guranu kod Vodnjana u blizini kojeg je smještena farma ovaca. U Epidemiološkom vjesniku (Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2008.) navodi se da je infekciji bilo izloženo 40 od kojih je u 8 dijagnosticirana Q-groznica, a kao izvor zaraze navode se ovce.

U stadima ovaca Q-groznica se najčešće otkrije tek kad obole ljudi, jer se u životinja klinički vidljiva bolest pojavljuje vrlo rijetko. Cvetnić i suradnici (2003.) opisuju pojavu Q-groznice na području Topuskoga 2001. godine. Tijekom lipnja i srpnja 2001. godine u selima u okolini Topuskoga oboljelo je 18 ljudi, a tijekom listopada, studenoga i prosinca još 12 ljudi. Ljeti su oboljeli ljudi koji su dolazili u kontakt s inficiranim životinjama, a u jesen, ljudi koji su boravili u prostorijama u kojim su prethodno boravile ovce te ljudi koji su čistili vunu zaraženih ovaca. Da bi se utvrdila raširenost Q-groznice u ovaca testirano je 665 krvi ovaca. Pozitivne reakcije utvrđene su u 105 (15,8%) pretraženih krvi ovaca. Najveći broj zaraženih ovaca (82) bio je u jednog vlasnika koji je i sam obolio od Q-groznice. Poduzete su propisane mjere evidencije i prijave oboljelih, liječenje, dezinfekcija kuća oboljelih osoba, stalni zdravstveni nadzor nad žiteljima zahvaćenog područja, uklanjanje serološki pozitivnih ovaca, neškodljivo uklanjanje životinjskih leševa i njihovih izlučevina, dezinfekcija životinjskih nastambi i seoskih dvorišta, nadzor nad ukupnim prometom životinja i životinjskih proizvoda i drugo. Svi oboljeli ljudi izliječeni su od Q-groznice.

## 2.4. Patogeneza i patologija

### 2.4.1. Patogeneza

Patogeneza infekcije bakterijom *C. burnetii* u ljudi još nije u potpunosti razjašnjena. Na temelju rezultata pokusa na animalnim modelima doneseni su sljedeći zaključci o načinu infekcije: nakon početne infekcije na mjestu ulaska (najčešće pluća) bakteriju fagocitiraju makrofagi te ju raznose po cijelom tijelu uzrokujući pri tome oštećenja u plućima, jetri i slezeni. Nakon ulaska u stanicu domaćina bakterija raste i razvija se zahvaljujući kiselom pH u fagolizosomu. Umnažanje u fagolizosomu rezultira propadanjem stanice i posljedične infekcije ostalih stanica tkiva što pogoduje širenju uzročnika u organizmu inficiranog domaćina. U animalnih modela infekcijom su najviše zahvaćeni slezena, jetra i druga tkiva retikuloendotelnog sustava što se najvjerojatnije događa i u ljudi (Slika 7.) (Waag, 2007.).



**Slika 7.** Shematski prikaz infekcije bakterijom *C. burnetii* u ljudi.

(Preuzeto s internetske stranice [http://standeyo.com/News\\_Files/NBC/Bio.Bugs.Q.html](http://standeyo.com/News_Files/NBC/Bio.Bugs.Q.html) 5.8.2012.)

U akutnoj fazi bolesti bakterija *C. burnetii* može se dokazati u krvi, koštanoj srži, urinu, bubrezima, posteljici i nekim drugim tkivima. Nakon što prođe akutna faza bolesti, bakterija se više ne može dokazati u krvi no prisutna je u monocitima, koštanoj srži, slezeni, prostati i jetri. U jednom slučaju infekcije ovom bakterijom, DNA i antigeni bakterije *C. burnetii* dokazani su u slezeni i prostati pacijenta čak 71 godinu nakon primarne infekcije, a serološkim pretragama nije se mogla dokazati kronična infekcija (nije bilo protutijela). U pacijenata koji boluju od kronične infekcije antigeni bakterije *C. burnetii* dokazani su u

srčanim zaliscima, vaskularnom tkivu, sjemenu, plućima, koštanoj srži i jetri (Van Wijk i sur., 2011.).

## 2.4.2. Infekcija u ljudi

### 2.4.2.1. Akutna infekcija

Glavna značajka Q-groznice u ljudi je klinički polimorfizam koji je ujedno i najvažniji razlog zbog kojeg se vrlo često ova bolest ne dijagnosticira. Q-groznica može imati akutni i kronični tijek. Ako je riječ o akutnom obliku bolesti inkubacija iznosi 14 do 39 dana i ovisi o dozi kojom je čovjek zaražen. U 50-60% slučajeva nema izraženih znakova bolesti ili se pak očituju kao jako povišena temperatura (39-40°C), teška glavobolja, bolovi u mišićima i kašalj što su također i znakovi influence u ljudi. Povišena temperatura potraje 5 do 14 dana no ako bolesnik nije liječen može potrajati i do 57 dana. Najčešći znakovi koji prate akutni tijek Q-groznice su atipična pneumonija i hepatitis. U 2% slučajeva javljaju se srčani problemi a miokarditis je glavni uzrok smrti. U 5-21% slučajeva u bolesnika se očituju promjene na koži, a bolest ponekad prati i meningoencefalitis, encefalitis i meningitis. Smrtnost je 1 do 2% (Porter i sur., 2011a.; Angelakis i Raoult, 2010.).

### 2.4.2.2. Utjecaj načina infekcije i virulentnosti soja na znakove bolesti

U Novoj Škotskoj u Kanadi, Švicarskoj i sjevernoj Španjolskoj akutna Q-groznica najčešće se očituje kao pneumonija a u Francuskoj i južnoj Španjolskoj kao granulomatozni hepatitis. Mnogi istraživači stoga pretpostavljaju da način infekcije ima utjecaj na kliničke znakove Q-groznice. La Scola i suradnici (1997.) radili su pokuse na zamorčićima i primijetili da nakon intraperitonealne inokulacije bakterije *C. burnetii* patološke promjene nastaju uglavnom na jetri, a nakon intranazalne inokulacije promjene su uglavnom na plućima. Miokarditis se očitovao samo kod životinja koje su primile najviše doze inokuluma, a kod takvih je životinja uzročnik izdvojen i iz krvi. Zaključak istraživanja bio je da oboje, i način infekcije i veličina inokuluma, utječu na kliničku sliku Q-groznice.

Razliku u kliničkoj slici Q-groznice uzrokuje i infekcija s različitim sojevima ove bakterije koji se razlikuju u virulenciji. Sojevi bakterije *C. burnetii* izdvojeni iz mlijeka bili su manje virulentni kada su inokulirani zamorčićima i miševima od sojeva izdvojenih iz krpelja (Kocianova i sur., 2001.). Titar protutijela u miševa inficiranih sa sojevima izdvojenim iz mlijeka bio je niži od titra u miševa inficiranih sa sojevima izdvojenim iz krpelja. Također, specifična protutijela nastala na sojeve izdvojene iz mlijeka javila su se u miševa 10 dana

nakon infekcije, dok su se specifična protutijela nastala na sojeve izdvojene iz krpelja javila 7 dana nakon infekcije. Također, u zamorčića inficiranih sojevima izdvojenim iz krpelja povišenje tjelesne temperature bilo je izraženije nego u zamorčića inficiranih sojevima izdvojenim iz mlijeka.

#### 2.4.2.3. Kronični oblik Q-groznice

Kronični oblik Q-groznice može se razvijati mjesecima ili čak godinama nakon infekcije, a najčešći je u pacijenata s valvulopatijama i vaskularnim abnormalnostima te imunosuprimiranih osoba. Kronična infekcija se javlja u 5% inficiranih osoba, a u 70% nastaje endokarditis. Također, posljedica kronične infekcije je kronični hepatitis, osteomijelitis, artritis i sindrom kroničnog umora. Također, opisani su i slučajevi meningitisa, encefalitisa, paralize okulomotornog živca i brojne druge neurološke poremetnje. Klinički znakovi neuroloških poremetnji su glavobolje, promjene ponašanja, manjak kognitivnih funkcija, konvulzije pa čak i epileptički napadaji. Infekcija često zahvaća više organa istovremeno (Porter i sur., 2011a.; Angelakis i Raoult, 2010.; Maurin i Raoult, 1999.).

Sindrom kroničnog umora javlja se u 15 % pacijenata nakon akutne faze Q-groznice. Može trajati 10 i više godina. Sindrom se javlja zbog poremećene regulacije u proizvodnji citokina koja je uzrokovana trajnim prisustvom antigena bakterije *C. burnetii* kao što su LPS i razni proteini (Marmion i sur., 2009.).

Smrtnost pacijenata s kroničnom Q-groznicom 1987. godine je bila 37% dok je posljednjih godina niža od 5%. Smatra se da se stopa smrtnosti smanjila zbog pravovremene dijagnoze bolesti i učinkovitog liječenja (Angelakis i Raoult, 2010.).

Kronični oblik Q-groznice liječi se antibioticima no ono ne rezultira uvijek potpunim uklanjanjem bakterije iz organizma te se pacijenti nerijetko moraju liječiti do kraja života da bi se spriječila reaktivacija bolesti (Maurin i Raoult, 1999.). Bilo bi poželjno proizvesti cjepivo koje bi osnažilo imunitet pacijenta i omogućilo imunosnom sustavu da potpuno uništi i ukloni bakteriju iz organizma (Shannon i Heinzen, 2009.).

U pacijenata s kroničnim oblikom Q-groznice primijećena je povišena razina interleukina-10 (IL-10) što je posljedica toga što mononuklearne stanice periferne krvi (PBMC) u pacijenata s kroničnim oblikom bolesti spontano proizvode povećanu količinu IL-10 (Capo i sur., 1996.). Honstetter i suradnici (2003.) uočili su povezanost razine IL-10 koju luče PBMC stanice pacijenata oboljelih od akutnog oblika Q-groznice i progresiju akutnog oblika prema kroničnom obliku Q-groznice. IL-10 inducira rast bakterije *C. burnetii* u



monocitima ljudi (Ghigo i sur., 2001.). Smatra se da IL-10 potiče umnažanje bakterije *C. burnetii* tako što inhibira TNF. Vrsta *C. burnetii* uspostavlja postojaniju infekciju u transgenih miševa čiji makrofagi prekomjerno ekspresiraju IL-10 (macIL-10tg). Ti makrofagi ne ubijaju bakteriju, a miševi razvijaju patologiju sličnu onoj u pacijenata s kroničnim oblikom Q-groznice. Zbog toga su macIL-10tg miševi dobar model za proučavanje kroničnog oblika ove bolesti (Meghari i sur., 2008.). S obzirom na to da IL-10 ima važnu ulogu u infekciji vrstom *C. burnetii* za razumijevanje patologije infekcije bilo potrebno utvrditi koje su stanice, osim T-limfocita, važan izvor IL-10 *in vivo* (Shannon i Heinzen, 2009.).

#### 2.4.2.4. Q-groznica u žena i muškaraca

Kod Q-groznice u muškaraca se javljaju teži simptomi nego u žena iako je seroprevalencija ista. Stoga su Leone i suradnici (2004.) pretpostavili da spolni hormoni imaju ulogu u patogenezi infekcije vrstom *C. burnetii*. Radili su pokuse na miševima i uočili da 17 beta-estradiol reducira ukupan broj bakterija kao i broj granuloma nastalih u tkivima pokusno inficiranih ženki. Iz toga su zaključili da bi spolni hormoni mogli imati utjecaj na veću otpornost žena na infekciju.

#### 2.4.2.5. Utjecaj dobi pacijenta na otpornost na infekciju

U nekoliko istraživanja dovelo se u vezu mlađu populaciju s većom otpornošću na infekciju. U epidemiji Q-groznice u Švicarskoj pet puta veću vjerojatnost za infekciju imali su ljudi stariji od 15 godina od onih mlađih od 15 (Angelakis i Raoult, 2010.).

#### 2.4.2.6. Trudnoća

U trudnica infekcija vrstom *C. burnetii* može izazvati pobačaj, smrt novorođenčeta, preuranjeni porođaj ili smanjenu težinu novorođenčeta, no može proći i bez simptoma (Arricau-Bouvery i Rodolakis, 2005.).

### 2.4.3. Infekcija u životinja

Q-groznica u životinja naziva se još i koksioelozom a najčešće nije praćena vidljivim kliničkim znakovima. Pokazatelji infekcije u goveda, ovaca i koza su pobačaji, nevitarna mladunčad, smanjena porođajna težina i neplodnost (Palmer i sur., 1983.; To i sur., 1998.). U

akutnoj fazi bolesti bakterija se može dokazati u krvi, plućima, slezeni i jetri. Akutni oblik Q-groznice često poprima kronični tijek a inficirane životinje bakteriju izlučuju urinom i fecesom. Primarna mjesta kronične infekcije u ženki su maternica i mliječne žlijezde, stoga se prilikom poroda u okoliš izlučuju velike količine bakterija, najviše u posteljici. Velike količine bakterija izlučuju se i mlijekom (Arricau Bouvery i sur., 2003.). Vrijeme izlučivanja bakterije *C. burnetii* vaginalnim sekretima, mlijekom i fecesom preživača nakon prirodne ili eksperimentalne infekcije stada (Arricau-Bouvery i Rodolakis, 2005.) prikazana je u Tablici 5.

**Tablica 5.** Najdulji zabilježeni period izlučivanja bakterije *C. burnetii* vaginalnim sekretom, mlijekom i fecesom preživača nakon prirodne ili eksperimentalne infekcije stada.

Vrsta životinje	Trajanje lučenja bakterije <i>C. burnetii</i>		
	Vaginalni sekret	Feces	Mlijeko
Krava	nije zabilježeno	14 dana	13 mjeseci
Koza	14 dana	20 dana	52 dana
Ovca	71 dan	8 dana nakon janjenja	8 dana

(Preuzeto iz Arricau-Bouvery i Rodolakis, 2005.)

#### 2.4.4. Liječenje Q-groznice u ljudi

Za liječenje akutnog oblika Q-groznice koristi se doksiciklin ili neki drugi antimikrobni lijek sličnog djelovanja ovisno o izraženim znakovima bolesti, dobi i stanju pacijenta (Delsing i sur., 2010.). U Tablici 6. prikazane su smjernice za liječenje Q-groznice.

Kronični oblik Q-groznice liječi se kombinacijom doksiciklina i hidroksiklorokina ne kraće od 18 mjeseci. Međutim, dugotrajno liječenje antibioticima ima nuspojave. U 100% tako liječenih pacijenata očitovala se fotosenzitivnost, a u nekih mučnina, glavobolja i vrtoglavica. Zbog navedenih nuspojava, pacijenti moraju biti pod stalnim liječničkim nadzorom. Naročito su važne redovite oftalmološke kontrole jer hidroksiklorokin može dovesti do ireverzibilnih makulopatija (Raoult i sur., 1999.).

**Tablica 6.** Smjernice za liječenje Q-groznice.

Klinička značajka	Pacijenti	Liječenje	Trajanje
Akutni oblik Q-groznice	Odrasli	doksiciklin (100 mg/dan)	14 dana
		fluorokinoloni (200 mg tri puta na dan)	14-21 dan
		ili pefloksacin (400 mg)	
		rifampin (1200 mg/danu)	21 dan
	Trudnice	trimetoprim (320 mg) i sulfametoksazol (1600 mg)	> 5 tjedana
	Djeca	doksiciklin (100 mg/dan)	10-14 dana
Kronični oblik Q-groznice	Odrasli	doksiciklin (100 mg/dan) i hidroksiklorokin (600 mg)	>18 mjeseci
	Djeca	trimetoprim i sulfametoksazol	>18 mjeseci

(Preuzeto iz Angelakis i Raoult, 2010.)

#### 2.4.5. Cjepivo protiv Q-groznice

Do sada su u svijetu proizvedena različita cjepiva protiv Q-groznice. Kloroform-metanolski ekstrakti bakterije *C. burnetii* faze I pokazali su se uspješni na pokusnim životinjama i u volontera no još uvijek nisu dovoljno istraženi. Smatra se da bi ovako proizvedeno cjepivo moglo imati manje nuspojave od cjepiva koja se sastoje od inaktiviranih bakterija (Waag i sur., 2008.). Cijepljenje vakcinom koja sadrži formalinom inaktiviranu bakteriju faze I pruža do 300 puta bolju zaštitu od cijepljenja vakcinom koja sadrži bakteriju faze II. Jedina razlika između faze I i II, za koju se zna, je u veličini i građi LPS-a. Iz navedenog može se pretpostaviti da je LPS faze I ključan za stvaranje imunosti na infekciju bakterijom *C. burnetii*. Tu tezu podržava i eksperiment u kojem su miševi cijepljeni pročišćenim LPS-om stekli imunost na infekciju ovom bakterijom (Zhang i sur., 2007.). Međutim, 100%-tni čisti LPS nije jednostavno izdvojiti, pa se ne može sa sigurnošću tvrditi da uz LPS nisu bili prisutni i neki drugi antigeni koji su pridonijeli stvaranju imunosti.

U Australiji se već više od 25 godina cjepivom „Q-VAX“ cijepi ljudi izloženi riziku od infekcije uzročnikom Q-groznice. Cjepivo „Q-VAX“ (CSL Limited, Parkville, Victoria, Australija) sadrži formalinom inaktiviranu bakteriju *C. burnetii* faze I soj Henzerling. Cjepivo se aplicira potkožno a imunost je doživotna. Prije cijepljenja potrebno je napraviti tzv. kožni test kod osoba koje su prethodno bile izložene infekciji jer može doći do reakcije preosjetljivosti nakon cijepljenja. No, i u osoba koje prije nisu bile u doticaju s bakterijom nakon cijepljenja mogu se očitovati neke nuspojave kao što su glavobolja i simptomi slični

influenzi (Marmion i sur., 1990.). Stoga se još uvijek istražuje cjepivo koje bi bilo potpuno neškodljivo i za koje nije potrebno pretestiranje.

Identificirani su mnogi antigeni koji bi mogli poslužiti kao cjepivo protiv Q-groznice. U eksperimentima je cijepljenje životinja nativnim proteinima pružalo zaštitu dok cijepljenje istim ali rekombinantnim proteinima nije pružalo zaštitu. Moguća objašnjenja su da je za stvaranje zaštite bitna konformacija proteina, ili se nativni proteini ne mogu 100% pročistiti pa se uz njih nalaze i neki drugi antigeni, najvjerojatnije LPS, koji pridonose stvaranju imunosti. Li i suradnici (2005.) u svom radu pokazali su da rekombinantni proteini P1 i HspB ne pružaju zaštitu dok fuzijski protein P1-HspB pruža potpunu zaštitu. Prema tome trebalo bi ustanoviti koji bi antigeni zajedno primijenjeni inducirali imunost na infekciju bakterijom *C. burnetii*. Beare i suradnici (2008.) konstruirali su DNA mikročipove pomoću kojih su identificirali više od 50 potencijalnih proteina prikladnih za cjepivo za ljude. U tijeku su daljnja istraživanja.

Arricau-Bouvery i suradnici (2005.) uspoređivali su cjepiva za životinje Coxevac, cjepivo faze I (CEVA Santé Animale, Francuska) i Chlamyvac FQ, cjepivo faze II (MERIAL, Francuska). Pokazalo se da cjepivo faze I štiti od pobačaja i sprječava izlučivanje bakterija vaginalnim sekretom, fecesom i mlijekom. Kod inficiranih ili neinficiranih ali gravidnih životinja cjepivo je neučinkovito. Cjepivo faze II nije imalo utjecaj ni na razvoj bolesti ni na izlučivanje bakterije. Problem vezan uz cijepljenje je nemogućnost razlikovanja cijepljenih i prirodno inficiranih životinja pomoću metode ELISA koja se koristi za dijagnosticiranje Q-groznice. Također, u Nizozemskoj su inficirana stada identificirana utvrđivanjem prisustva DNA bakterije *C. burnetii* u skupnim uzorcima mlijeka. Hermans i suradnici (2011.) naknadno su dokazali da se DNA bakterije *C. burnetii* iz cjepiva izlučuje mlijekom što je utjecalo na način testiranja na Q-groznicu.

#### **2.4.6. Bakterija *C. burnetii* kao biološko oružje**

Svjetska zdravstvena organizacija (*World Health Organisation*, WHO) proglasila je bakteriju *C. burnetii* potencijalnim biološkim oružjem (WHO, 2004.). U 20. stoljeću SAD i SSSR koristili su ovu bakteriju u različitim programima kao biološko oružje (Madariaga i sur., 2003.). U slučaju biološkog napada, bakterija bi najvjerojatnije bila distribuirana u obliku aerosola. Inhalacija bakterije rezultira pneumonijom, a infektivna doza je jedna do 10 bakterija (Tigertt i sur., 1961.). Nakon inhalacije simptomi se mogu javiti nakon 10 do 90 dana, ovisno o dozi. Manje doze ne izazivaju simptome ili se javljaju blagi oblici bolesti

praćeni neproduktivnim kašljem, povišenom tjelesnom temperaturom, neznatnim promjenama pri disanju ili je ono u granicama fizioloških vrijednosti. Akutna pneumonija pak dovodi do teškoća u disanju. Stopa smrtnosti je 0,5 do 1,5 % (Tissot-Dupont i sur., 1992.).

U studiji kojom su proučavali upotrebu bakterije *C. burnetii* kao biološkog oružja, WHO je procijenila da kad bi se 50 kg bakterije raspršilo u zrak iznad gusto naseljenog područja, gradova s oko 500 000 stanovnika, oboljelo bi 125 000 ljudi sa znakovima akutne Q-groznice, 9000 ljudi imalo bi kronični oblik Q-groznice a 150 ljudi bi vjerojatno umrlo (WHO, 1970). Tijekom epidemije Q-groznice u Nizozemskoj, od studenog 2009. godine, potvrđeno je 2293 slučajeva Q-groznice u ljudi, a šest oboljelih je umrlo. Ti podatci pokazuju da su procjene WHO krive i da bi posljedice biološkog napada mogle biti puno teže. Do lipnja godine 2010. u Nizozemskoj se pojavio još 421 slučaj Q-groznice u ljudi što pokazuje da su stroge mjere kontrole koje se sastoje od izlučivanja zaraženih životinja iz stada i vakcinacije domaćih životinja imale učinka pa je epidemija konačno bila pod nadzorom.

#### **2.4.7. Eksperimenti s bakterijom *C. burnetii***

Eksperimenti s bakterijom *C. burnetii* provedeni su tijekom operacije „Whitecoat“ pod nazivom CD-22 1955. godine u SAD-u. Cilj tog istraživanja bio je utvrditi minimalnu infektivnu dozu za ljude i procijeniti učinkovitost cjepiva. Volonteri, mlađi odrasli muškarci, su u prostorijama vojnog istraživačkog centra Fort Detrick (Frederick, SAD) bili izloženi aerosolu kontaminiranom bakterijom (Tigertt i sur., 1961.). Nakon inhalacije 10 L aerosola, praćeno je vrijeme potrebno da se javi perzistentna povišena tjelesna temperatura iznad 37,78°C (100°F) (Tablica 7.). Nakon povišenja tjelesne temperature, volonteri su liječeni oksitetraciklinom. Utvrdili su da je uzimanje istog lijeka peroralno nakon izlaganja, a prije pojave simptoma bolesti, učinkovito u prevenciji bolesti (Tigertt i sur., 1961.). Vakcinacija je bila učinkovita i nakon aplikacije visokih doza bakterije *C. burnetii*. Iste godine, volonteri, pokusni zamorčici i primati izloženi su bakteriji *C. burnetii* u uvjetima koji su oponašali biološki napad. Aerosol bakterije bio je pušten na udaljenosti 3000 stopa (914.4 m) od promatranih subjekata, tijekom noći, u pustinji Dugway Proving Ground u državi Utah (SAD). Cilj je bio dostaviti 150 infektivnih jedinica svakom promatranom subjektu. Na kraju istraživanja svi volonteri tretirani su antibioticima i u potpunosti su se oporavili. S obzirom da postoji i kronični oblik bolesti, volonteri su promatrani kroz dulji period i nikakve posljedice nisu zabilježene (Pittman i sur., 2005.).

**Tablica 7.** Infekcija zamorčica i ljudi inhalacijom aerosola kontaminiranog bakterijom *C. burnetii*.

Doza bakterije <i>C. burnetii</i>	Serokonverzija u zamorčica (pozitivni/izloženi)	Vrijeme do pojave vrućice u zamorčica (dani)	Serokonverzija u ljudi (pozitivni/izloženi)	Vrijeme do pojave vrućice u ljudi (dani)
1	0/29	12,5	0/2	17
10	1/26	nije prikazano	4/5 (dvije subkliničke infekcije)	16
102	4/24	11	7/8	15
103	22/27	9	4/5	13,5
104	28/28	8,5	4/4	10,5
105	24/24	7	2/2	10

(Preuzeto iz Oyston i Davies, 2011.)

## 2.5. Dijagnostika infekcije bakterijom *C. burnetii*

Za dijagnostiku Q-groznice u ljudi i životinja najčešće se koriste tri serološke metode: indirektna imunofluorescencija (engl. *Indirect ImmunoFluorescence Assay*, IFA), imunoenzimski test (engl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ELISA) i reakcija vezanja komplementa (RVK). Svim navedenim postupcima dokazuju se protutijela za bakteriju *C. burnetii* i prikladne su za pretraživanje stada životinja na prisutnost infekcije. No kako protutijela ostaju u krvi i nakon izliječenja, a dokazano je širenje Q-groznice te pobačaji kod seronegativnih životinja, spomenute metode trebalo bi nadopuniti dodatnim dijagnostičkim postupcima (World Organisation for Animal Health, 2011.).

Izdvajanje bakterije provodi se inokulacijom oplodjenih kokošnjih jaja, staničnih kultura, pokusnom infekcijom laboratorijskih životinja. Sam postupak iznimno je opasan te su do sada opisani mnogi slučajevi pojave Q-groznice u laboratorijskog osoblja. Izdvajanje ove iznimno infektivne bakterije obavlja se isključivo u laboratorijima koji imaju najmanje razinu 3 sigurnosti (Slika 8.) (Perrin i Bengtson, 1942.; Ormsbee, 1952.).



**Slika 8.** Postupak izdvajanja bakterije *C. burnetii* inokulacijom oplodjenih kokošnjih jaja. (Preuzeto iz Sidi-Boumedine i Rousset, 2011.)

Molekularnom metodom lančane reakcije polimerazom – PCR-om (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) može se dokazati DNA bakterije *C. burnetii* u staničnim kulturama, ali i drugim biološkim materijalima. Najosjetljiviji postupak je PCR kojim se dokazuje ponavljajući insercijski slijed *IS1111* genoma bakterije *C. burnetii* (Sidi-Boumedine, 2010.;

Berri i sur., 2000.). Real-time PCR-om mogu se dokazati puno manje količine DNA u pretraživanim uzorcima nego konvencionalnim PCR-om. Također real-time PCR-om može se odrediti i koncentracija bakterijske DNA u uzorku (Kim i sur., 2005.; Klee i sur., 2006.). Tijekom epidemije Q-groznice u Nizozemskoj uspoređene su molekularne i serološke metode za dijagnostiku Q-groznice (Schneeberger i sur., 2010). Real-time PCR je učinkovit u dokazivanju DNA bakterije *C. burnetii* u ranom stadiju infekcije no imunofluorescencija za dokaz protutijela bila je pouzdanija u stadiju bolesti u kojem su se u krvi pojavila protutijela. Tada se zbog imunosnog odgovora organizma broj bakterija u krvi spusti ispod razine koju je moguće dokazati molekularnim metodama dijagnostike.

Za genotipizaciju bakterije *C. burnetii* do sada su korištene mnoge metode. Prve analize kromosomske i plazmidne DNA bakterije metodom RFLP (engl. *Restriction Fragment Length Polymorphisms*) ukazale su na genetičku heterogenost izolata (Vodkin i sur., 1986.). Daljnjim analizama metodom RFLP pomoću elektroforeza SDS-PAGE (engl. *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide - Pulsed Field Gel Electrophoresis*) (Hendrix i sur., 1991.) i PFGE (engl. *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) (Heinzen i sur., 1990.) izolati bakterije *C. burnetii* svrstani su u 6 genomskih grupa (I-VI). Izolati pacijenata s akutnim tijekom Q-groznice svrstani su u grupe I, II i III, a izolati pacijenata s kroničnim tijekom Q-groznice u grupe IV i V. Pokazalo se da izolati u grupama I, II i III sadrže plazmid QpH1, grupa IV sadrži QpRS, a izolati grupe V nemaju plazmid (Heinzen i sur., 1990.) ali zato u kromosomu imaju ugrađenu sekvencu homolognu plazmidu QpRS (Willems i sur., 1997.). Za izolate iz grupe VI prvotno se smatralo da sadrže plazmid QpDG, a naknadno je dokazano da je QpDG najvjerojatnije QpH1. Izolati koji sadrže QpDG pokazali su se nevirulentnim za zamorčice (Jäger i sur., 2002.). Također, smatralo se da određeni izolati vrste *C. burnetii* uzrokuju akutnu ili kroničnu Q-groznicu ovisno o plazmidu koji imaju no dokazano je da akutni ili kronični oblik ovise o stanju imunosnog sustava pacijenta te njegovu općem zdravstvenom stanju (Thiele i Willems, 1994.). Tipizacija izolata koja se temelji na plazmidima nije pouzdana metoda jer je dokazano da epidemiološki nepovezani sojevi imaju isti plazmid. Također, plazmidi se kao mobilni izvankromosomski elementi mogu lako izgubiti prilikom ponovljenog uzgoja u laboratoriju (subkultiviranje) (Aarts i sur., 2001.).

Metoda RFLP temelji se na cijepanju bakterijske DNA restriktivnim enzimima, elektroforezi dobivenih odsječaka DNA te analizi dobivenih prikaza odsječaka (Heinzen i sur., 1990.; Jäger i sur., 1998.). Prednost ove metode je diskriminatorska moć (dobiveno je 20 različitih tipova izolata) te reproducibilnost dok su negativne strane ove metode potreba za



uzgojem bakterije *C. burnetii*, dugotrajan postupak izolacije DNA te cijepanje restrikcijskim enzimima zbog čega genotipizacija izolata ovom metodom može potrajati tjednima.

Bakterija *C. burnetii* sadrži gen za transpozazu *IS1111* koji se u genomu soja Nine Mile faze I (9Mi/I) nalazi na 20 lokusa. Transpozaza *IS1111* poslužila je Denisonu i suradnicima (2007.) za razvoj metode tipizacije izolata bakterija. Oni su konstruirali početnice specifične za 20 lokusa na kojima se nalazi *IS1111*, napravili reakcije PCR-a, te uspoređivali izolate na temelju produkata PCR-a za te lokuse. Određivali su postojanje produkta za određeni lokus i njegovu veličinu. Rezultati tipizacije uzoraka poklapali su se s rezultatima dobivenim metodom RFLP prema kojima su izolati svrstani u 6 grupa (Hendrix i sur., 1991.). Da bi se metoda dalje razvijala potrebno je proučiti mehanizme i učestalost transpozicije *IS1111*.

Metoda IRS-PCR (engl. *Infrequent Restriction Site-PCR*) uključuje cijepanje bakterijske DNA restrikcijskim enzimima, dodavanje adaptera (oligonukleotida) koji se vežu na pocijepane krajeve odsječaka DNA, ponovnu restrikciju pomoću istih enzima te umnažanje dobivenih odsječaka u četiri različite reakcije PCR-a (Arricau-Bouvery i sur., 2006.; Cloeckaert i sur., 2003.). Ovom metodom determinirano je 7 različitih izolata dok su se isti izolati metodom MLVA (engl. *Multi Locus VNTR Analysis, Variable Number of Tandem Repeats*) mogli podijeliti u 11 različitih sojeva. Osim slabe diskriminatorne moći, za navedenu metodu potrebno je i uzgojiti bakteriju kako bi se dobile velike količine čiste bakterijske DNA.

Dostupnost sekvenci genoma patogenih bakterija omogućilo je razvoj metode DNA mikročipova (engl. *DNA microarray*) kojom se uspoređuju sekvence cijelih genoma različitih sojeva ili različitih vrsta bakterija. Beare i suradnici (2006.) su na temelju objavljene sekvence genoma *C. burnetii* Nine Mile I (RSA493) (Seshadri i sur., 2003.) konstruirali DNA mikročip pomoću kojeg su usporedili genome 24 izolata bakterije *C. burnetii* dobivena iz različitih izvora i geografskih područja. Utvrdili su da su genomi vrlo ujednačeni (konzervirani) no među njima postoje razlike u 139 otvorenih okvira čitanja (engl. *Open Reading Frames, ORF*). Najčešće se radilo o delecijama cijelih ORF-ova, a 25 polimorfizama je uključivalo delecije, točkaste mutacije i insercije unutar ORF-ova. Pretpostavljaju da ti polimorfizmi utječu na biološka svojstva izolata kao što je primjerice virulencija. Na temelju rezultata dobivenih metodom DNA mikročipova, 24 izolata svrstana su u 8 grupa. Takvo grupiranje izolata je u skladu s prijašnjim grupiranjem istih izolata na temelju rezultata metode RFLP (Hendrix i sur., 1991.).

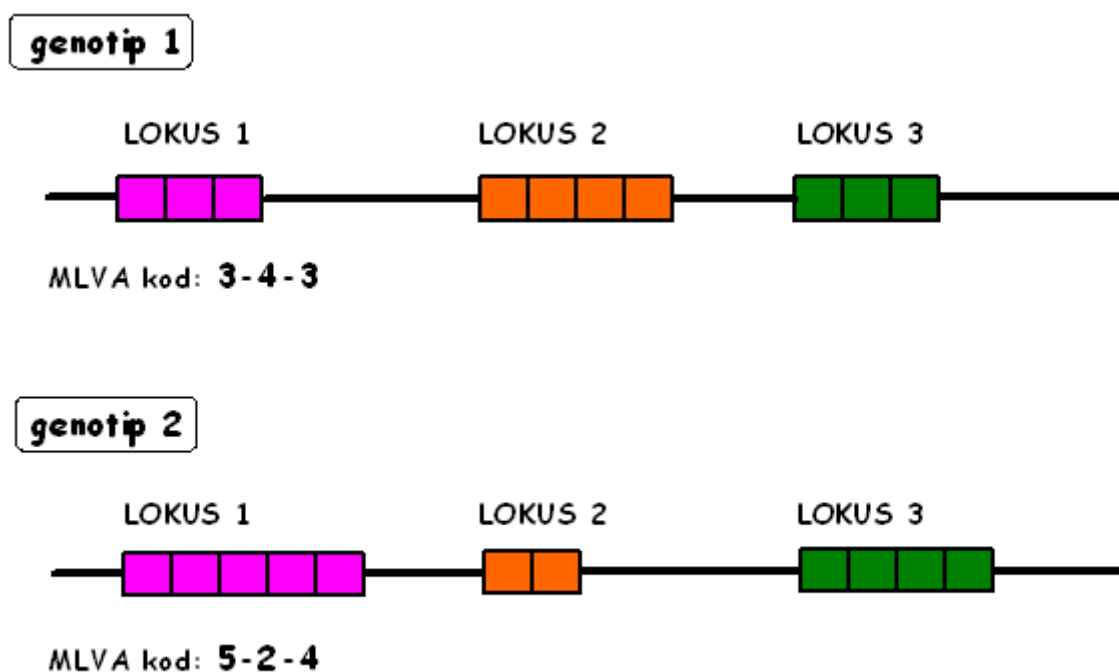
Metoda MLST (engl. *Multilocus Sequence Typing*) koristi se za tipizaciju nekih vrsta bakterija, a zasniva se na sekvenciranju kratkih odsječaka unutar kućepaziteljskih gena (engl. *housekeeping genes*) na određenim lokusima (Maiden i sur., 1998.). Kako su kućepaziteljski geni bakterije *C. burnetii* slabo varijabilni, Glazunova i suradnici (2005.) su za tipizaciju bakterije uveli metodu MST (engl. *Multispacer Sequence Typing*). Metoda MST se temelji na sekvenciranju međugenskih regija koje su potencijalno varijabilne jer su pod manjim selekcijskim pritiskom nego susjedni geni. Rezultati dobiveni genotipizacijom pomoću metode MST mogu se usporediti s genotipovima objavljenim na internetskoj stranici <http://ifr48.timone.univ-mrs.fr>. Ova metoda omogućava jednostavnu usporedbu i razmjenu rezultata među laboratorijima koji se bave dijagnostikom i istraživanjima ove bakterije no sekvenciranje je skuplje od ostalih metoda pa je malo vjerojatno da će je mnogi laboratoriji moći uvesti kao rutinsku dijagnostičku pretragu.

Huijsmans i suradnici (2011.) uveli su genotipizaciju bakterije *C. burnetii* metodom SNP (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*, polimorfizam u jednoj bazi). Utvrđivali su polimorfizme na 10 lokusa, a genotipizirali su 28 referentnih sojeva koji su prethodno bili genotipizirani metodom MLVA, te 40 ljudskih i životinjskih izolata izdvojenih u epidemiji Q-groznice u Nizozemskoj koje je vladala u periodu od 2007. do 2010. godine. U ljudi su utvrdili tri genotipa, a u životinja četiri genotipa, s tim da se dva ista genotipa javljaju u ljudi i životinja. Iz dobivenih rezultata zaključili su da su se ljudi zarazili od zaraženih životinja, a kako su ljudi bolovali od kroničnog oblika Q-groznice pretpostavili su da taj genotip izaziva kronični oblik Q-groznice. Neki genotipovi koji su dokazani u nizozemskih izolata, utvrđeni su i u sojeva izdvojenih iz jarčeva i ovnova u Francuskoj i Maroku. Referentne sojeve, njih 28, grupirali su metodom SNP u devet genotipova dok su u prijašnjim radovima isti izolati metodom MLVA grupirani u 14 genotipova. Svojim radom su ukazali na poklapanje rezultata grupiranja izolata među metodama te na manju diskriminatornu moć metode SNP u odnosu na metodu MLVA.

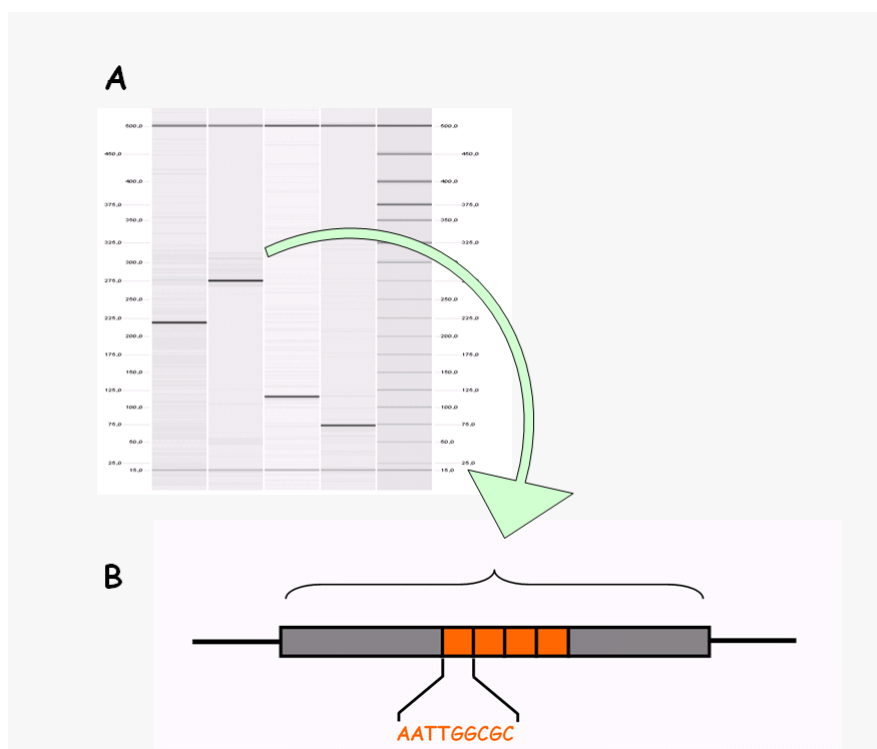
### 2.5.1. Metoda MLVA

Metoda MLVA, analiza broja uzastopnih ponavljajućih sljedova na različitim lokusima (engl. *Multi-Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis* ili *Multi-Locus VNTR Analysis*) je nedavno postala metoda izbora za genotipizaciju mnogih mikroorganizama kao što su *E. coli* 0157 (Murphy i sur., 2008.), *Bacillus anthracis* (Le Flèche i sur., 2001.) i *Mycobacterium tuberculosis* (Supply i sur., 2000.). Genotipizacija

metodom MLVA zasniva se na razlikama u broju ponavljanja uzastopno ponavljajućih sljedova (engl. *tandem repeats*, TR) na određenim lokusima genoma mikroorganizama. Broj ponavljanja TR varira do čega dolazi prilikom pogrešnog sparivanja skliznutog lanca (engl. *slipped-strand mispairing*) ili klizanja DNA (engl. *DNA slippage*) prilikom replikacije DNA (Sia i sur., 2000.). Razlika u broju ponavljanja TR se dokazuje metodom PCR pomoću početnica specifičnih za određeni lokus. Nakon PCR-a elektroforezom se odredi veličina odsječka umnožene DNA a na temelju veličine odsječka odredi se broj ponavljanja TR (Murphy i sur., 2008.). Na Slici 9. shematski su prikazana dva različita genotipa, a na Slici 10. prikazano je određivanje broja ponavljanja TR metodom MLVA.



**Slika 9.** Shematski prikaz dva različita genotipa. Uspoređena su tri lokusa. Jedan kvadratić predstavlja jedan ponavljajući slijed (TR). Npr. na lokusu 2, TR (narančasti kvadratić) se ponavlja 4 puta kod genotipa 1, a kod genotipa 2 se ponavlja 2 puta. (Shema napravljena prema shemi na internetskoj stranici <http://www.applied-maths.com/bionumerics/plugins/mlva.htm>, 8.12.2011.)



**Slika 10.** Određivanje broja ponavljanja TR. A – prikaz rezultata elektroforeze odsječaka DNA umnoženih metodom PCR specifičnom za lokus 2; B – shematski prikaz odsječka DNA umnoženog metodom PCR specifičnom za lokus 2. Odsječak se sastoji od 4 TR (4 narančasta kvadratića) i dijela uzvodno i dijela nizvodno od TR (sivo). Sekvenca TR je AATTGGCGC. Broj ponavljanja TR izračuna se tako da se od veličine umnoženog odsječka DNA oduzme veličina dijela uzvodno i dijela nizvodno od TR te se dobiveni broj podijeli s veličinom TR. (Shema napravljena prema shemi preuzetoj s internetske stranice <http://www.applied-maths.com/bionumerics/plugins/mlva.htm> , 08.12.2011.)

Seshadri i suradnici su 2003. godine objavili sekvencu cijelog genoma bakterije *C. burnetii* čime je omogućeno uvođenje metode MLVA za genotipizaciju bakterije. Također, za uvođenje ove metode potrebni su kompjuterski programi pomoću kojih se u sekvenci genoma traže lokusi na kojima postoje TR (Benson, 1999.; Denoeud i Vergnaud, 2004.). Lokusi izabrani za MLVA moraju zadovoljavati određene kriterije: veličina TR mora biti veća od 4 pb ali manja od 30 pb kako bi se veličine TR mogle analizirati elektroforezom na agaroznom gelu i sekvenca TR mora biti konzervirana više od 90% (Svraka i sur., 2006.).

Svraka i suradnici (2006.) su metodom MLVA genotipizirali 21 soj bakterija *C. burnetii* prateći pritom 7 lokusa. Podatke su analizirali koristeći kompjuterski program Bionummerics 4.0 (Applied-Maths, Belgija) metodom UPGMA (engl. *Unweighted Pair-Group Method With Arithmetic Mean*). Ovi su autori primijetili razliku u rezultatima

dobivenim kapilarnom elektroforezom pomoću uređaja ABI 3700 DNA sequencer (Applied Biosystems, SAD) analiziranih programom GeneScan i rezultata dobivenih sekvenciranjem također pomoću uređaja ABI 3700 DNA sequencer. Smatraju da do nepodudaranja rezultata dolazi zbog sekundarne strukture produkata PCR-a. Pri određivanju broja ponavljanja u obzir su uzeli podatke dobivene kapilarnom elektroforezom. Analizirane uzorke, njih 21, ovom metodom su svrstali u devet različitih genotipova čime je dokazana velika raznolikost pretraženih uzoraka. Uspoređivanjem genotipova istih sojeva bakterije *C. burnetii* u različitim fazama životnog ciklusa dobivenih iz različitih laboratorija diljem svijeta utvrdili su da su identični čime su istodobno dokazali stabilnost odabranih markera te činjenicu da genotip ne ovisi o fazi u kojoj se bakterija nalazi. Također, dokazali su razlike između izolata bakterija izdvojenih iz pacijenata koji su bolovali od akutnog i kroničnog oblika Q-groznice i izolata izdvojenih iz krpelja što je u skladu s prijašnjim istraživanjima (Hendrix i sur., 1991.). U radu su usporedili svoje rezultate s rezultatima dobivenim metodom MST Glazunove i suradnika (2005.) te su dokazali da metoda MLVA ima veću moć razlučivanja od metode MST.

Arricau-Bouvery i suradnici (2006.) tipizirali su 14 izolata bakterije *C. burnetii* metodom IRS-PCR te su dokazali da je broj fragmenata DNA dobivenih tom metodom manji nego broj koji su istim postupkom dobili drugi istraživači (Franciosa i sur., 2001.) čime su ukazali na problem ponovljivosti rezultata među laboratorijima. Za genotipizaciju metodom MLVA izabrali su 17 lokusa. Podijelili su ih u panel 1; 10 lokusa s TR jednakim ili većim od 9 pb i panel 2; 7 lokusa s TR veličine 6 ili 7 pb. Izabrani lokusi obuhvaćaju lokuse analizirane u radu Svake i suradnika (2006.) no za jedan lokus tvrde da je veličina ponavljajuće sekvence 7 pb dok Svaka i suradnici (2006.) tvrde da je veličina te ponavljajuće sekvence 21 pb. U radu su koristili 42 izolata bakterije *C. burnetii* koje su na temelju rezultata metode MLVA svrstali u 22 genotipa koristeći samo panel 1 ili 36 genotipova koristeći i panel 2. Usporedili su rezultate dobivene analizom 14 izolata metodom IRS-PCR i MLVA. Metodom IRS-PCR identificirano je šest, a metodom MLVA 11 genotipova što upućuje na veću moć razlučivanja metodom MLVA. No dva izolata koji su metodom IRS-PCR identificirani kao dva različita genotipa, metodom MLVA su identificirani kao 1 genotip. Među ostalim izolatima, metodom MLVA su genotipizirali 11 referentnih sojeva (Scurry Q217, R1140, Namibia, Priscilla Q177, Nine Mile RSA493, J-3, Dugway 5J108-111, Z 2775/90, CS-Florian, Z 3464/92 and Z 349-36/94) prethodno genotipiziranih metodom MST (Glazunova i sur., 2005.). Klasteri dobiveni genotipizacijom metodom MLVA korištenjem lokusa panela 1 uglavnom su se poklapali s klasterima dobivenim genotipizacijom metodom MST.

Metoda MLVA ima visoku reproducibilnost, pokazala je veliku diskriminatornu moć u tipiziranju bakterija, a baze podataka s genotipovima MLVA se lako uspostavljaju nakon što se odaberu prikladni markeri (lokusi) (Denoeud i Vergnaud, 2004.).

Svoj rad Arricau-Bouvery i suradnici (2006.) smatraju korakom naprijed prema razvoju metode MLVA za genotipizaciju *C. burnetii*. Oni smatraju da bi se neki opisani lokusi, naročito panela 2, mogli pokazati prevarijabilni da bi ih se koristilo za tipizaciju no to će se znati tek nakon tipizacije većeg broja izolata. Također, kad budu dostupne sekvence ostalih sojeva bakterije *C. burnetii* osim referentnog soja Nine Mile RS493 (Sheshadri i sur., 2003.) možda će biti pronađeni novi lokusi prikladni za genotipizaciju.

U Poljskoj su 2009. godine Chmielewski i suradnici genotipizirali šest poljskih izolata bakterije *C. burnetii* metodom MST (Glazunova i sur., 2005.) i metodom MLVA (Arricau-Bouvery i sur., 2006.), pri čemu su referentne sojeve Nine Mile i Henzerling koristili kao kontrole. Metodom MST uspjeli su razlučiti dva, a metodom MLVA četiri genotipa. Za jedan MLVA genotip bakterije *C. burnetii* dokazali su da potječe od ovaca uvezenih iz Rumunjske. Taj genotip je bio izoliran 1956. godine i nakon toga se više nije javio. Smatraju da je iskorijenjen zahvaljujući dobrim sanitarnim mjerama i eliminacijom zaraženih životinja. Za drugi genotip nisu utvrdili izvor, no za treći smatraju da je izvor infekcije sjeme za umjetnu oplodnju. Četvrti genotip dokazan je u 10-godišnjeg dječaka koji je boravio u inozemstvu, a poklapa se s genotipom MLVA soja Henzerling koji potječe iz Italije. Nisu naveli u kojoj stranoj zemlji je dječak boravio. Zaključili su da su izolati iz Poljske srodni s izolatima iz Njemačke i Austrije nego s izolatima iz Francuske.

Klaassen i suradnici (2009.) su u tijeku epidemije Q-groznice u Nizozemskoj od 2007. do 2009. godine metodom MLVA genotipizirali 11 uzoraka izdvojenih iz ljudi i životinja. Za MLVA su koristili DNA izoliranu iz kliničkih uzoraka (seruma, obrisaka ždrijela i rodnice, sputuma, urina) dok se u prijašnjim radovima (Svraka i sur., 2006.; Arricau-Bouvery i sur., 2006.; Chmielewski i sur., 2009.) prvo izdvajala bakterija, a tek onda se iz bakterije izolirala DNA. Za genotipizaciju su koristili samo tri lokusa za koje su smatrali da je najveća vjerojatnost da će se umnožiti u reakciji PCR jer imaju najkraće TR, no razmatraju daljnju genotipizaciju upotrebom ostalih markera. Kod jednog pacijenta utvrđen je isti genotip kao u njegovih ovaca stoga pretpostavljaju da su ovce izvor infekcije. Dokazali su prisustvo više različitih genotipova koji se razlikuju samo u jednom ponavljanju pa su zaključili da su ti genotipovi mikrovarijante jednog hipervarijabilnog soja.

U Nizozemskoj 2007. godine zabilježena je jedna od najvećih epidemija Q-groznice u svijetu (Roest i sur., 2011.). U četiri godine zaraženo je gotovo 4000 ljudi. Od 2005. do 2009.

godine na 28 farmi mliječnih koza i 2 farme mliječnih ovaca javili su se pobačaji s visokim postotkom (čak do 80%). Smatra se da su se ljudi zarazili od malih preživača. Roest i suradnici (2011.) su metodom MLVA genotipizirali uzorke DNA *C. burnetii* izolirane iz posteljica, organa fetusa, obrisaka rodnice i mlijeka krava, koza i goveda. Koristili su 10 od mogućih 17 lokusa (Arricau-Bouvery i sur., 2006.) s tim da su za dva lokusa dizajnirali nove početnice. Od 238 uzoraka koji su metodom PCR bili pozitivni na Q-groznici za 125 uzoraka (53%) dobili su genotip MLVA u kojem nedostaju najviše dvije vrijednosti: kod 52 uzorka dobiven je cijeli genotip, kod 48 uzoraka nedostaje jedna vrijednost, a kod 25 uzoraka nedostaju dvije vrijednosti. Kod 113 (47%) uzoraka dobili su djelomične genotipove u kojima nedostaje 3–10 vrijednosti.

U prijašnjim radovima genotipizacija metodom MLVA je rađena na prethodno izdvojenim i uzgojenim sojevima bakterije *C. burnetii* (Svraka i sur., 2006.; Arricau-Bouvery i sur., 2006.; Chmielewski i sur., 2009.) dok je u radovima Klaassena i suradnika (2009.) i Roesta i suradnika (2011.) genotipizacija rađena pomoću DNA izolirane iz različitih uzoraka. Najveća mana tipizacije takvih uzoraka je nejednaka kvaliteta i varijabilna količina DNA. Pri genotipizaciji se javljaju nepotpuni genotipovi no ne zna se da li vrijednosti za neke lokuse izostaju zbog male koncentracije i loše kvalitete DNA ili ti lokusi jednostavno nisu prisutni u nekih sojeva bakterija. Ako neki lokusi nisu prisutni, za očekivati je da se neće pojaviti ni u uzorcima s velikim koncentracijama DNA. No to nije bio slučaj u radu Roesta i suradnika (2011.). Uzorci s većim koncentracijama DNA dali su potpune, a s manjim koncentracijama nepotpune genotipove. Roest i suradnici (2011.) su tipizacijom 125 uzoraka dobili 13 genotipova pri čemu je prevladavao jedan genotip, a ostali genotipovi javili su se u jednom odnosno tri slučaja. Smatraju da taj jedan genotip prevladava iz dva razloga. Prvi je taj da se broj mliječnih koza sa 100 000, 2000. godine, popeo na 230 000 u 2009. godini, a većina koza je uzgojena u Nizozemskoj. Iz toga bi se dalo zaključiti da je taj određeni genotip bakterije *C. burnetii* bio prisutan u Nizozemskoj i prije početka epidemije Q-groznice 2005. godine. Toj teoriji ne ide u prilog rezultat genotipizacije DNA izolirane iz posteljice kože iz 2001. godine koji pokazuje nepoklapanje na dva lokusa s prevladavajućim genotipom u Nizozemskoj. Drugi razlog zbog kojeg jedan genotip prevladava u Nizozemskoj bi mogao biti da taj genotip uzrokuje pobačaje, a pri pobačajima se bakterija *C. burnetii* vrlo lako prenosi na druge životinje osobito kada je riječ o tako gustoj populaciji koza. Pitanje je i da li je taj genotip virulentniji od ostalih. Roest i suradnici (2011.) su dobivenih 13 nizozemskih genotipova usporedili sa srodnim genotipovima (ako se prati 9 lokusa) objavljenim u bazi podataka (<http://minisatellites.u-psud.fr/MLVAnet/querypub1.php>: Coxiella2007 [accessed

2011 Jan 11]). Iz rezultata usporedbe su zaključili da je prevladavajući nizozemski genotip jedinstven za Nizozemsku premda nisu isključili mogućnost da je takav zaključak rezultat obrade nedovoljnog broja uzoraka. Jedan izolat iz Francuske ima genotip vrlo srodan nizozemskom pa se smatra da je možda potekao iz Nizozemske.

U Tablici 8. prikazani su objavljeni radovi u kojima je bakterija *C. burnetii* genotipizirana metodom MLVA.

**Tablica 8.** Prikaz radova u kojima je bakterija *C. burnetii* genotipizirana metodom MLVA.

Referenca	Godina objave	Broj lokusa MLVA	Broj obrađenih uzoraka	Broj dobivenih genotipova
Svraka i sur.	2006.	7	21	9
Arricau-Bouvery i sur.	2006.	17	42	36
Chmielewski i sur.	2009.	17	6	4
Klaassen i sur.	2009.	3	11	4
Roest i sur.	2011.	10	125	13

Na internetskoj stranici <http://minisatellites.u-psud.fr> nalaze se dvije baze podataka s objavljenim MLVA genotipovima bakterije *C. burnetii*, *Coxiella2007* i *Coxiella2009\_Netherlands*. U Tablici 9. su navedeni lokusi MLVA korišteni u tim bazama podataka i u pojedinim radovima.

**Tablica 9.** Prikaz lokusa MLVA korištenih u pojedinoj referenci ili bazi podataka.

Referenca ili baza podataka	Lokusi korišteni u referenci ili bazi podataka																
	Panel 1										Panel 2						
Svraka i sur., (2006.)								ms 26			ms 23	ms 24	ms 27	ms 28	ms 31		ms 34
Arricau-Bouvery i sur., (2006.)	ms 01	ms 03	ms 07	ms 12	ms 20	ms 21	ms 22	ms 26	ms 30	ms 36	ms 23	ms 24	ms 27	ms 28	ms 31	ms 33	ms 34
Chmielewski i sur., (2009.)	ms 01	ms 03	ms 07	ms 12	ms 20	ms 21	ms 22	ms 26	ms 30	ms 36	ms 23	ms 24	ms 27	ms 28	ms 31	ms 33	ms 34
Klaassen i sur., (2009.)													ms 27	ms 28			ms 34
Roest i sur., (2011.)		ms 03				ms 21	ms 22		ms 30	ms 36		ms 24	ms 27	ms 28	ms 31		ms 34
Coxiella2007		ms 03		ms 12		ms 21	ms 22		ms 30	ms 36			ms 27	ms 28	ms 31		ms 34
Coxiella2009_ Netherlands											ms 23	ms 24	ms 27	ms 28		ms 33	ms 34



### **3. *MATERIJALI I METODE***

### 3.1. Materijali

Svake godine Ministarstvo poljoprivrede donosi novu „Naredbu o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju“ (u daljnjem tekstu Naredba) kojom se definira na koje bolesti i kojim postupcima se životinje moraju testirati. Od 2004. do 2008. godine prema Naredbi se kod svakog pobačaja krava, junica, ovaca i koza morala provesti laboratorijska pretraga na Q-groznicu. Tako su u Laboratorij za bakterijske zoonoze i molekularnu dijagnostiku bakterijskih bolesti Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu (u daljnjem tekstu Laboratorij) dostavljane krvi koje su metodom RVK pretražene na Q-groznicu. Od 2009. godine prema Naredbi se osim krvi moraju dostaviti i lohije i obrisici rodnice životinja koje su pobacile. Osim lohija i obrisaka rodnice bili su dostavljani i organi pobačenih plodova (jetra i sadržaj želuca), posteljice, mlijeko i feces (Tablica 10.). Osim spomenutih životinjskih uzoraka u laboratorij su dostavljene i krvi ljudi za koje se sumnjalo da su zaraženi Q-groznicom (Tablica 11.). Iz krvi u kojima su postupkom RVK dokazana protutijela za Q-groznicu te ostalih uzoraka izolirana je DNA i metodom TRANS $\frac{1}{2}$  PCR dokazivana DNA bakterije *C. burnetii*. Metodom TRANS $\frac{1}{2}$  PCR ukupno je pretraženo 2636 uzoraka (izoliranih DNA).

**Tablica 10.** Vrsta uzoraka u kojima je dokazivana DNA bakterije *C. burnetii*.

Vrsta uzorka	Broj pretraženih uzoraka
krv	1881
obrisak rodnice	296
organi pobačenog ploda (jetra i/ili sadržaj želuca)	255
mlijeko	12
posteljica	152
lohije	37
feces	3
<b>UKUPNO</b>	<b>2636</b>

**Tablica 11.** Podrijetlo uzoraka u kojima je dokazivana DNA bakterije *C. burnetii*

Podrijetlo uzorka	Broj pretraženih uzoraka
čovjek	186
ovca	1151
koza	45
govedo	627
konj	627
<b>UKUPNO</b>	<b>2636</b>

Za genotipizaciju metodom MLVA odabrano je 49 uzoraka (izoliranih DNA) u kojih je metodom TRANS $\frac{1}{2}$  PCR dokazano prisustvo DNA bakterije *C. burnetii*. Brojem 1 označen je najstariji uzorak, DNA izolirana 2004. godine, a ostali brojevi slijede kronološki slijed izoliranja bakterijske DNA. Najnoviji uzorak, broj 49, je DNA izolirana u ožujku 2012. godine. Uzorci su odabrani tako da je iz svakog uzgoja uzet jedan uzorak. Kad je od jednog vlasnika došlo više uzoraka, npr. 10 krvi koza, za genotipizaciju je izabrana samo jedna krv odnosno DNA izolirana iz te krvi, koja je u elektroforezi nakon TRANS  $\frac{1}{2}$  PCR-a imala najintenzivniji bend. Na taj su način za genotipizaciju izabrani uzorci s najvećom koncentracijom DNA bakterije *C. burnetii*. Iz svakog uzgoja uglavnom je izabran samo jedan uzorak pod pretpostavkom da je izvor infekcije bio isti za sve životinje iz jednog uzgoja. Više uzoraka iz istog uzgoja uzimano je onda kada je bilo riječ o velikim uzgojima s 50 i više životinja ili ako je u uzgoju bilo više različitih životinjskih vrsta (Tablica 12.). U Tablici 12. navedene su županije iz koje potječe uzorak i godine kada su izolirane DNA iz uzoraka odnosno kada je uzorak dostavljen na pretragu u Laboratorij.

**Tablica 12.** Uzorci izabrani za genotipizaciju metodom MLVA.

Oznaka uzorka	Datum izolacije DNA	Županija	Podrijetlo uzorka	Vrsta uzorka
1	16.09.2005.	Splitsko - dalmatinska	koza	krv
2	18.03.2011.	Zadarska	koza	krv
3	12.9.2005.	Zadarska	koza	krv
4	5.10.2005.	Splitsko - dalmatinska	konj	krv
5	6.10.2005.	Splitsko - dalmatinska	konj	krv
6	6.10.2005.	Bjelovarsko - bilogorska	konj	krv
7	10.10.2005.	Splitsko - dalmatinska	konj	krv
8	10.2005.	BIH	ovca	krv
9	10.2005.	Splitsko - dalmatinska	ovca	krv
10	10.2005.	Splitsko - dalmatinska	koza	krv
11	10.2005.	Zagrebačka	govedo	krv
12	18.03.2011.	Splitsko - dalmatinska	koza	krv
13	28.2.2006.	Sisačko-moslavačka	govedo	krv
14	6.3.2006.	Zadarska	čovjek	krv
15	6.3.2006.	Zadarska	koza	krv
16	16.3.2006.	Osječko-baranjska	govedo	obrisak rodnice
17	16.3.2006.	Splitsko - dalmatinska	govedo	obrisak rodnice
18	20.3.2006.	Splitsko - dalmatinska	ovca	krv
19	14.2.2007.	BiH	čovjek	krv
20	14.2.2010.	Zadarska	koza	krv
21	13.3.2007.	Ličko-senjska	ovca	krv
22	27.3.2007.	Ličko-senjska	ovca	krv
23	18.4.2007.	Ličko-senjska	ovca	krv
24	20.2.2008.	Ličko-senjska	koza	organi ploda
25	7.3.2010.	Ličko-senjska	koza	krv
26	1.2.2010.	Splitsko - dalmatinska	koza	krv
27*	18.2.2010.	Šibensko - kninska	koza	organi ploda
28	18.2.2010.	Splitsko - dalmatinska	koza	organi ploda
29	18.2.2010.	Splitsko - dalmatinska	koza	krv
30	19.2.2010.	Splitsko - dalmatinska	koza	organi ploda
31	2.3.2010.	Ličko - senjska	koza	organi ploda
32	2.3.2010.	Ličko - senjska	koza	organi ploda
33*	5.3.2010.	Šibensko - kninska	koza	organi ploda
34	9.3.2010.	Ličko - senjska	koza	krv
35	9.3.2010.	Šibensko - kninska	koza	krv
36	25.3.2010.	Šibensko - kninska	koza	organi ploda
37	10.8.2010.	Bjelovarsko - bilogorska	govedo	krv
38	11.03.2011.	Zagrebačka	govedo	organi ploda
39	11.03.2011.	Šibensko - kninska	koza	organi ploda
40	25.03.2011.	Šibensko - kninska	ovca	organi ploda
41	05.09.2011.	Osječko-baranjska	govedo	obrisak rodnice
42	13.02.2012.	Zadarska	koza	obrisak rodnice
43	17.02.2012.	Koprivničko-križevačka	govedo	mlijeko
44	07.03.2012.	Zadarska	koza	obrisak rodnice
45	21.03.2012.	Vukovarsko-srijemska	govedo	obrisak rodnice
46	21.03.2012.	Vukovarsko-srijemska	govedo	posteljica
47	23.03.2012.	Sisačko-moslavačka	govedo	posteljica
48	26.03.2012.	Splitsko - dalmatinska	ovca	organi ploda
49	29.03.2012.	Zadarska	ovca	organi ploda

\*uzorci pripadaju istom uzgoju

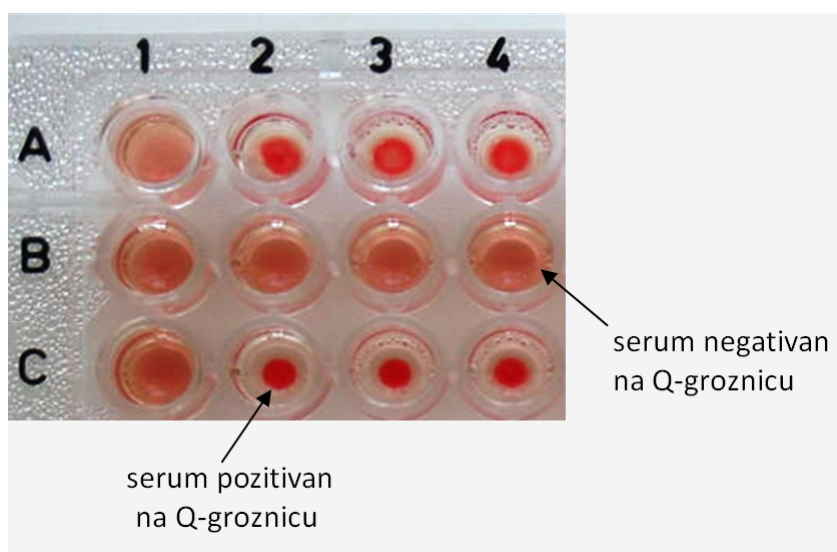
## 3.2. Metode

### 3.2.1. Metoda RVK

Krvi pristigle u Laboratorij testirane su na Q-groznicu serološkom metodom reakcije vezanja komplementa RVK. U ovoj serološkoj metodi reakcija antigen-protutijelo dokazuje se vezanjem komplementa. Vezanje komplementa vizualizira se pomoću indikatorske reakcije (hemolitičkog sustava). Hemolitički sustav sastoji se od ovčjih eritrocita i antieritrocitnih protutijela (amboceptor). Ako su u serumu prisutna protutijela za Q-groznicu nastaje kompleks antigen-protutijelo na koji se veže komplement pa izostaje liza eritrocita (sedimentacija eritrocita). Ako u serumu nema protutijela, komplement aktivira hemolitički sustav pa eritrociti budu lizirani. Prije svakog izvođenja RVK-a pripremaju se svježe otopine eritrocita (Koncentrat ovčjih eritrocita, Biognost, Hrvatska), komplementa (Guinea Pig Complement for the CFT, Siemens Njemačka), antigena (Q Fever Antigen for the CFT, Siemens, Njemačka) i amboceptora (Amboceptor for the CFT, Siemens, Njemačka). Ovčji eritrociti razrjeđuju se dodatkom fiziološke otopine tako da se dobije 2%-tna radna otopina. Komplement, antigen i amboceptor razrjeđuju se fiziološkom otopinom prema uputama proizvođača. Fiziološka otopina priprema tako se da se 8,5 g NaCl (p.a., Kemika, Hrvatska) otopi u 1000 ml destilirane vode (ELIX Millipore, SAD).

Metoda RVK se izvodi u mikrotitarskim pločicama s 96 jažica „U“ oblika. Prilikom svake pretrage koristi se pozitivna (Q Fever Control Serum, positive for the CFT, Siemens, Njemačka) i negativna kontrola (Q Fever Control Serum, positive for the CFT, Siemens, Njemačka). Rutinski se serumi pretražuju u razrjeđenju 1:10 (na 100 µl seruma doda se 900 µl fiziološke otopine), a u slučaju pozitivne reakcije pretraga se nastavlja do konačnog razrjeđenja. Razrijeđeni serumi prvo se inaktiviraju u vodenoj kupelji (Model 1013, GFL, Njemačka) tijekom 30 minuta pri temperaturi od 56°C za goveda, odnosno 60°C za ovce, koze i konje (pri zagrijavanju seruma inaktivira se komplement fiziološki prisutan u serumu). U prvu i drugu jažicu mikrotitarske pločice se stavi po 25 µl pretraživanog seruma, a zatim se u prvu jažicu doda 25 µl fiziološke otopine, a u drugu 25 µl antigena. U obje jažice se zatim doda po 25 µl komplementa. Pločica s dodanim serumima, antigenom i komplementom se inkubira preko noći u hladnjaku na 4°C. Drugi dan pripremi se hemolitička otopina koja se sastoji od 2%-tne otopine ovčjih eritrocita i amboceptora pomiješanih u omjeru 1:1, koja se zatim drži 30 minuta na sobnoj temperaturi. Pločica se izvadi iz hladnjaka i inkubira se u vodenoj kupelji 10 minuta na 37°C. Nakon inkubacije u sve jažice se dodaje 50 µl hemolitičke otopine, a zatim se pločica inkubira 30 minuta na 37°C. Nakon inkubacije očitava

se reakcija: prva jažica koja ne sadrži antigen služi za kontrolu antikomplementarnosti pretraživanog seruma i u njoj bi uvijek trebala biti prisutna potpuna hemoliza. U drugoj jažici prosuđuje se izostanak hemolize eritrocita uslijed reakcije antigen – protutijelo iz seruma. S obzirom na stupanj hemolize razlikuje se 0 (oznaka 4), 25 (oznaka 3), 50 (oznaka 2), 75 (oznaka 1) i 100%-tna hemoliza (oznaka -) (Slika 11.). Ako je u razrijeđenju seruma 1:10 reakcija pozitivna, pretraga se nastavlja do konačnog razrjeđenja seruma, odnosno određivanja titra seruma. Pri pripremi razrjeđenja postupak za prvu i drugu jažicu je isti dok se u treću, četvrtu, petu i sve ostale jažice dodaje 25 µl fiziološke otopine. U treću jažicu dodaje se 25 µl seruma, promiješa se i 25 µl razrijeđenog seruma se prenosi u četvrtu jažicu, promiješa se i prenosi u petu jažicu i tako redom do konačnog razrjeđenja. Iz zadnje jažice izbacuje se 25 µl sadržaja jažice. Dalje se ponavlja već opisani postupak (dodavanje antigena, komplementa, ovčjih eritrocita i amboceptora te očitavanje reakcije). Serumi u kojima su dokazana protutijela se ponovno testiraju i odvajaju za testiranje s ostalim serološkim metodama.



**Slika 11.** Slika jažica sa serumima pretraživanim na Q-grozniciu metodom RVK.

### 3.2.2. Izolacija DNA

Iz krvi koje su metodom RVK bile pozitivne na Q-grozniciu i uzoraka mlijeka, fecesa, posteljica, lohija i obrisaka rodnica životinja koje su pobacile te organa pobačenih plodova (jetre i sadržaja želuca) izolirana je DNA. Izolacija DNA je rađena ručno pomoću

komercijalnog kita za izolaciju DNA QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, SAD) ili pomoću uređaja za automatsku izolaciju DNA QIAcube (Qiagen, SAD) (Slika 12.).

Izolacija DNA iz tkiva se izvodi tako da se u tubicu volumena 2 ml (Safe-Lock Tubes, 2.0 ml, Eppendorf, Njemačka) stavi oko 25 mg tkiva, zatim se doda 180 µl pufera ATL (Qiagen, SAD) i 20 µl proteinaze K (Qiagen, SAD). Tubica s tkivom i dodanim reagensima se vorteksira (Vortex mixer SA8, Stuart, UK) 20 sekundi i stavi u termoblok (Thermomixer comfort, Eppendorf, Njemačka), preko noći na temperaturi od 56°C uz istodobno tresenje pri 1500 okretaja u minuti.

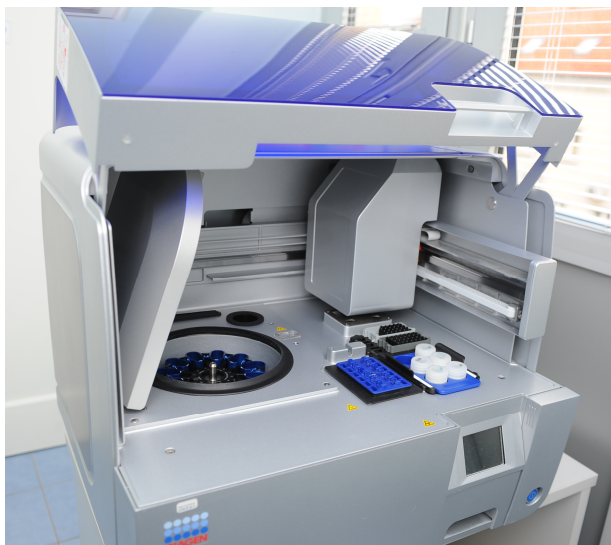
Da bi se DNA izolirala iz obriska, u tubicu volumena 2 ml (Safe-Lock Tubes, 2.0 ml, Eppendorf, Njemačka) se doda 1 ml otopine PBS-a (Phosphate Buffered Saline, Compelisa Diluting Buffer, tablets, Veterinary Laboratories Agency, Velika Britanija), obrisak se uroni u PBS a vrh obriska odreže se tako da se tubica može zatvoriti i potom vorteksira. Nakon toga vrh obriska se baci, a otopina centrifugira na 14000 g tijekom jedne minute (Centrifuge 5417C, Eppendorf, Njemačka), nakon čega se supernatant odbaci a talog resuspendira u 200 µl PBS-a.

Izolacija DNA iz krvi se radi tako da se puna krv vorteksira te se 200 µl prebaci u tubicu volumena 2 ml. Ako se DNA izolira iz seruma, 200 µl seruma se prebaci u tubicu volumena 2 ml.

Tako pripremljena tkiva, brisevi, krvi i serumi se koriste u daljnjoj izolaciji DNA, ručnoj ili automatskoj pomoću uređaja QIAcube, prema uputama proizvođača.

Pri ručnoj izolaciji DNA, u pripremljene uzorke se doda 200 µl pufera AL. Dobivena smjesa se zatim vorteksira 15 sekundi i inkubira 10 minuta pri 56°C (ako se radi o tkivima inkubacija je 10 minuta pri 70°C). Nakon inkubacije, u smjesu se doda 200 µl etanola (Ethanol absolute for analysis, Merck, Njemačka), vorteksira se 15 sekundi i cijela smjesa se prebaci na kolonicu. Kolonica se nalazi u tubici za filtrat. Slijedi centrifugiranje kolonica sa smjesom, 1 minutu na 6000 g, nakon čega se tubica s filtratom baci, a kolonica se stavi u novu tubicu koja se nalazi u kitu za izolaciju. Na kolonicu se doda 500 µl pufera AW1 i centrifugira se 1 minutu na 6000 g. Filtrat se baci, a kolonica se prebaci u novu tubicu. Na kolonicu se zatim doda 500 µl pufera AW2 i centrifugira se 3 minute na 20000 g. Filtrat se ponovo baci, a kolonica se prebaci u novu tubicu i centrifugira se 1 minutu na 20000 g kako bi se uklonili ostaci etanola. Kolonica se zatim prebaci u novu čistu tubicu od 1,5 ml (Safe-Lock Tubes, 1.5 ml, Eppendorf, Njemačka) u koju će se eluirati DNA. Na kolonicu se doda 200 µl pufera AE te se inkubira 1 minutu na sobnoj temperaturi. Zadnji korak je

centrifugiranje 1 minutu na 6000 g nakon čega se kolonica baca, a u tubici ostaje 200 µl DNA koja se koristi u daljnjim koracima identifikacije i genotipizacije.



**Slika 12.** QIAcube (Qiagen, SAD) uređaj za automatsku izolaciju DNA.

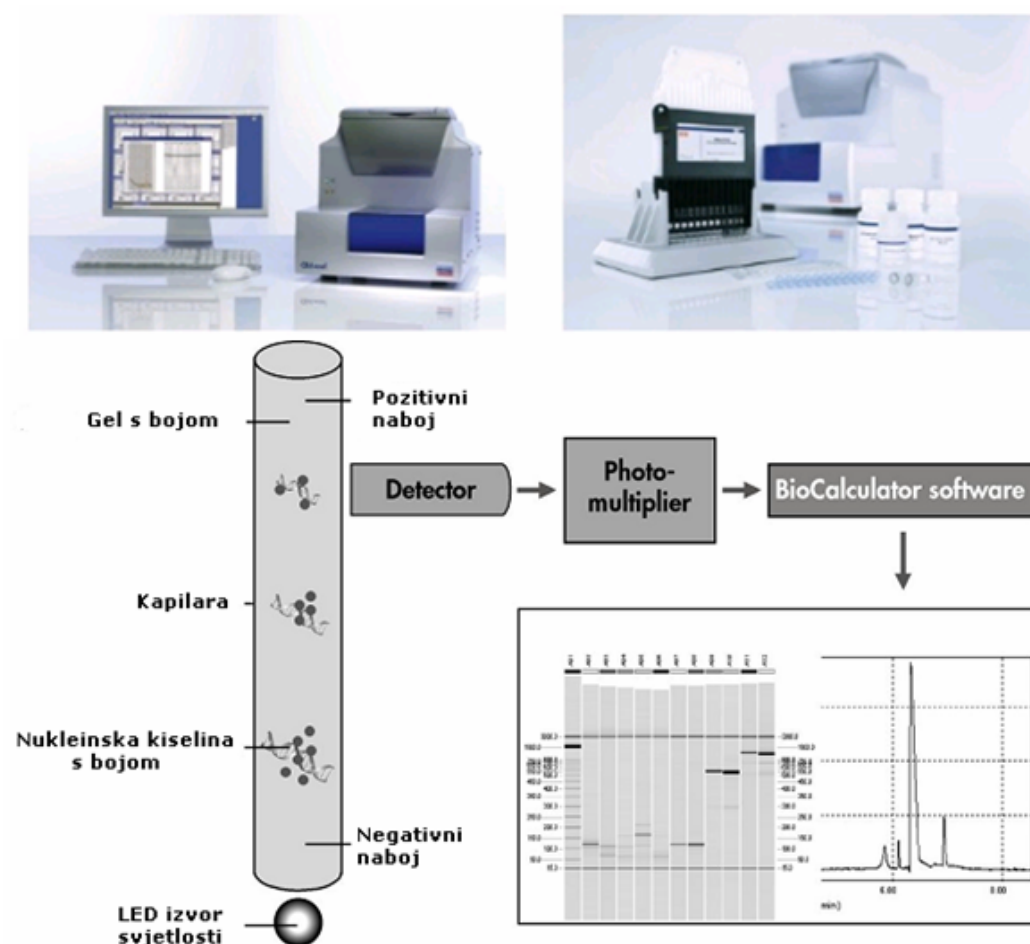
### 3.2.3. Utvrđivanje pripadnosti vrsti *Coxiella burnetii* metodom TRANS ½ PCR

Da bi se utvrdilo da izolirana DNA pripada bakteriji *C. burnetii*, korištena je metoda TRANS ½ PCR kojom je umnožen ponavljajući dio genoma bakterije *C. burnetii*, sličan transpozonomima (Hoover i sur., 1992.; Willems i sur., 1994.; Berri i sur., 2000.). PCR reakcijska smjesa ukupnog volumena 20 µl sadržavala je 10 µl mješavine HotStarTaq Master Mix (Qiagen, Njemačka), 6 µl vode (RNase-free Water, Qiagen, Njemačka), 1 µl početnice Trans1 (TAT GTA TCC ACC GTA GCC AGT C), 1 µl početnice Trans2 (CCC AAC AAC ACC TCC TTATTC) te 2 µl DNA. Konačna koncentracija svake početnice (Invitrogen, Velika Britanija) u reakcijskoj smjesi bila je 0,4 µM. Umnažanje je provedeno pomoću uređaja Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, SAD) s početnom denaturacijom pri 95°C tijekom 15 minuta, nakon koje je uslijedilo 5 ciklusa denaturacije pri 94°C tijekom 30 sekundi, vezanja početnica pri 66-61°C tijekom 1 minute (u svakom koraku temperatura prijanjanja početnica bila je jedan stupanj manja) i produljivanja lanaca pri 72°C tijekom 1 minute. Nakon prvih 5 ciklusa uslijedilo je još 35 ciklusa denaturacije pri 94°C 30 sekundi, vezanja početnica pri 61°C 30 sekundi i produljivanja lanaca pri 72°C 1 minutu te završni korak produljivanja lanaca pri 72°C 5 minuta. Veličina produkta umnažanja 687 parova baza (pb) dokazana je pomoću uređaja za kapilarnu elektroforezu QIAxcel (Qiagen, Njemačka) s kompjuterskim programom QIAxcel BioCalculator.



### 3.2.4. QIAxcel sustav

QIAxcel sustav koristi kapilarnu gel-elektroforezu koja omogućuje vrlo brzo odvajanje nukleinskih kiselina na temelju veličine. Za razliku od tradicionalnih agaroznih gel-elektroforeza razdvajanje se izvodi u kapilarama koje su dio predgotovljenog gel uloška. Svaki uzorak se djelovanjem električne struje nanosi u pojedinačnu kapilaru. Negativno nabijene molekule nukleinskih kiselina migriraju kroz kapilaru do pozitivno nabijenog kraja (Slika 13.). Kao i kod agarozne gel-elektroforeze, molekule male molekularne težine migriraju brže od onih velike molekularne težine. Kako molekule migriraju kroz kapilaru, prolaze detektor koji otkriva i mjeri fluorescentni signal. Foto-multiplicirajući detektor pretvara emisijski signal u podatak u elektronskom obliku, koji se zatim prenosi na računalo koji obrađuje dobivene podatke kompjuterskim programom QIAxcel BioCalculator. Nakon obrade, podaci se prikazuju kao elektroferogram ili slike gela (Qiagen, 2011).



**Slika 13.** QIAxcel sustav i načelo rada. (Preuzeto s internetske stranice <http://www.qiagen.com/products/qiaxcelsystem.aspx#Tabs=t1> 22.5.2012. i priručnika QIAxcel DNA Handbook, Qiagen, 2011.)

### 3.2.5. Metoda MLVA

#### 3.2.5.1. MLVA PCR

Genotipizacija DNA bakterije *C. burnetii* izvedena je metodom MLVA prema referenci Arricau-Bouvery i sur. (2006.). Za genotipizaciju je korišteno 17 parova početnica (Invitrogen, Velika Britanija). Svaki par početnica je specifičan za jedan lokus genoma bakterije. Prvih 10 lokusa ima ponavljajuće sljedove veličine 9 i više nukleotida i po referenci pripadaju panelu 1. Panelu 2 pripada ostalih sedam lokusa kod kojih su ponavljajući sljedovi veličine 6 ili 7 nukleotida. Imena lokusa i korištene početnice i prikazani su u Tablici 13.

Za svaki uzorak DNA bakterije *C. burnetii* rađena je po jedna reakcija PCR za svaki lokus. Reakcijska smjesa volumena 20 µl sadržavala je 10 µl mješavine HotStarTaq Master Mix (Qiagen, Njemačka), 6 µl vode (RNase-free Water, Qiagen, Njemačka), po 1 µl obje početnice (početna koncentracija 10 µM) te 2 µl DNA. Reakcija PCR se sastojala od početne denaturacije (95°C/15 min), nakon koje je uslijedilo 40 ciklusa denaturacije (95°C/30 sec), vezanja početnica (60°C/45 sec) i produljivanja lanaca (72°C/90 sec), te završni korak produljivanja lanaca (72°C/7 min). Reakcija PCR je provedena pomoću uređaja Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, SAD), a veličina produkata umnažanja je određena pomoću uređaja za kapilarnu elektroforezu QIAxcel (Qiagen, Njemačka) s kompjuterskim programom QIAxcel BioCalculator. Kao pozitivna kontrola (PK) u PCR reakcijama za svaki lokus MLVA korišten je referentni soj bakterije *C. burnetii* Nine Mile I (*Coxiella burnetii* phase I Antigen, Virion/Serion, Njemačka). Liofilizirani antigen je prema uputama proizvođača otopljen u 1 ml destilirane vode (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Invitrogen, Velika Britanija) te inaktiviran kuhanjem pri 95°C tijekom 20 minuta u termobloku (Thermomixer comfort, Eppendorf, Njemačka). Tako pripremljen antigen je korišten kao DNA kalup u PCR reakcijama. U PCR reakcijama za svaki lokus korištena je i negativna kontrola (NK) – u PCR reakcijsku smjesu je umjesto DNA dodano 2 µl vode (RNase-free Water, Qiagen, Njemačka).

**Tablica 13.** Početnice korištene u metodi MLVA

Redni broj	Lokus	Početnica (5'-3')
PANEL 1		
1	ms01	F: GGCTCATTCAATTTTAGCTTCG R: AACGTGGGGAAGTTTGTATTT
2	ms03	F: TTGTCGATAAATCGGGAACTT R:CACTGGGAAAAGGAGAAAAAGA
3	ms07	F: CTCTTAGCCATCGCTTACCACT R:AACGAAAATTGGTTTGCATTTT
4	ms12	F: GAAAATTGGTTTGCCTCTG R:CCTTCTCCCAAGAAGTTTAGCC
5	ms20	F: CTGAAACCAGTCTTCCCTCAAC R:CTTTATCTTGGCCTCGCCCTTC
6	ms21	F: AGCATCTGCCTTCTCAAGTTTC R:TGGGAGGTAGAAGAAAAGATGG
7	ms22	F: GGGGTTTGAACATAGCAATACC R:CAATATCTCTTTCTCCCGCATT
8	ms26	F: AGAATCAAACCTGCAAAACCTT R:TTGATTATTTTGAATTCGCTGGT
9	ms30	F: ATTTCTCGACATCAACGTCTT R:AGTCGATTTGGAAACGGATAAA
10	ms36	F: GAAACCAGTCTTCCCTCAACAG R:ATAACCGTCATCGTCACCTTCT
PANEL 2		
11	ms23	F: GGACAAAAATCAATAGCCCGTA R:GAAAACAGAGTTGTGTGGCTTC
12	ms24	F: ATGAAGAAAGGATGGAGGGACT R:GATAGCCTGGACAGAGGACAGT
13	ms27	F: TTTTGAGTAAAGGCAACCCAAT R:CAAACGTCGCACTAACTCTACG
14	ms28	F: TAGCAAAGAAATGTGAGGATCG R:ATTGAGCGAGAGAATCCGAATA
15	ms31	F: GGGCATCTAATCGAGATAATGG R:TTTGAGAAAAATTTGGGTGCTT
16	ms33	F: TAGGCAGAGGACAGAGGACAGT R:ATGGATTTAGCCAGCGATAAAA
17	ms34	F: TGAATATCAGCGACTCGAAGAA R:TCGTGCGTTAGTGTGCTTATCT

### 3.2.5.2. Tablica broja ponavljanja

U referenci Arricau-Bouvery i sur. (2006.) kao kontrolu u izvođenju metode MLVA koristili su referentni soj Nine Mile i za svaki lokus naveli su broj ponavljanja ponavljajućeg slijeda za taj lokus. Na primjer, za lokus ms01 naveli su da je broj ponavljanja 4, da je veličina ponavljajućeg slijeda 16 pb i da je veličina odsječka DNA dobivenog PCR-om 198 pb. Iz tih podataka izračunato je ako se nakon PCR-a za lokus ms01 dobije odsječak veličine

182 pb da je riječ o 3 ponavljanja ( $198 \text{ pb} - 16 \text{ pb} = 182 \text{ pb}$ ), a ako se dobije odsječak veličine 214 pb, riječ je o 5 ponavljanja ( $198 \text{ pb} + 16 \text{ pb} = 214 \text{ pb}$ ), itd. Prema podacima iz spomenutog rada sastavljena je tablica u kojoj su navedeni svi lokusi s veličinom ponavljajućeg slijeda za taj lokus te je veličinama odsječaka DNA dobivenih PCR-om pridružen odgovarajući broj ponavljanja (Tablica 14.). U tablici su veličine odsječaka DNA koje su Arricau-Bouvery i suradnici (2006.) dobili za soj bakterije *C. burnetii* Nine Mile označene crvenom bojom, a plavom bojom su označene veličine odsječaka DNA koje su za ostale sojeve dobili drugi istraživači.

**Tablica 14.** Tablica broja ponavljanja. Veličinama odsječaka DNA pridruženi su brojevi ponavljanja. Crvenom bojom označene su veličine odsječaka DNA koje su za soj bakterije *C. burnetii* Nine Mile I dobili Arricau-Bouvery i suradnici (2006.), a plavom bojom veličine odsječaka DNA koje su za ostale sojeve dobili drugi istraživači.

Pr. ponavljanje	PANEL 1										PANEL 2							
	ms01 (16bp)	ms03 (12bp)	ms07 (126bp)	ms12 (126bp)	ms20 (18bp)	ms21 (12bp)	ms22 (11bp)	ms26 (9bp)	ms30 (18bp)	ms36 (9bp)	ms23 (7bp)	ms24 (7bp)	ms27 (6bp)	ms28 (6bp)	ms31 (7bp)	ms33 (7bp)	ms34 (6bp)	
1	150	157	230	192	150	150	191	100	125	420	108	162	258	246	154	206	186	
2	166	169	356	318	168	162	202	109	143	429	115	169	264	252	161	213	192	
3	182	181	482	444	186	174	213	118	161	438	122	176	270	258	168	220	198	
4	198	193	608	570	204	186	224	127	179	447	129	183	276	264	175	227	204	
5	214	205	734	696	222	198	235	136	197	456	136	190	282	270	182	234	210	
6	230	217	860	822	240	210	246	145	215	465	143	197	288	276	189	241	216	
7	246	229	986	948	258	222	257	154	233	474	150	204	294	282	196	248	222	
8	262	241	1112	1074	276	234	268	163	251	483	157	211	300	288	203	255	228	
9	278	253	1238	1200	294	246	279	172	269	492	164	218	306	294	210	262	234	
10	294	265	1364	1326	312	258	290	181	287	501	171	225	312	300	217	269	240	
11	310	277	1490	1452	330	270	301	190	305	510	178	232	318	306	224	276	246	
12	326	289	1616	1578	348	282	312	199	323	519	185	239	324	312	231	283	252	
13	342	301	1742	1704	366	294	323	208	341	528	192	246	330	318	238	290	258	
14	358	313	1868	1830	384	306	334	217	359	537	199	253	336	324	245	297	264	
15	374	325	1994	1956	402	318	345	226	377	546	206	260	342	330	252	304	270	
16	390	337	2120	2082	420	330	356	235	395	555	213	267	348	336	259	311	276	
17	406	349	2246	2208	438	342	367	244	413	564	220	274	354	342	266	318	282	
18	422	361	2372	2334	456	354	378	253	431	573	227	281	360	348	273	325	288	
19	438	373	2498	2460	474	366	389	262	449	582	234	288	366	354	280	332	294	
20	454	385	2624	2586	492	378	400	271	467	591	241	295	372	360	287	339	300	
21	470	397	2750	2712	510	390	411	280	485	600	248	302	378	366	294	346	306	
22	486	409	2876	2838	528	402	422	289	503	609	255	309	384	372	301	353	312	
23	502	421	3002	2964	546	414	433	298	521	618	262	316	390	378	308	360	318	
24	518	433	3128	3090	564	426	444	307	539	627	269	323	396	384	315	367	324	
25	534	445	3254	3216	582	438	455	316	557	636	276	330	402	390	322	374	330	
26	550	457	3380	3342	600	450	466	325	575	645	283	337	408	396	329	381	336	
27	566	469	3506	3468	618	462	477	334	593	654	290	344	414	402	336	388	342	

### 3.2.5.3. MLVA genotip

Postupak određivanja genotipa za neki uzorak je sljedeći:

1. napravi se PCR za lokus ms01
2. napravi se elektroforeza te se odredi veličina umnoženog odsječka DNA
3. iz Tablice 14. se očita broj ponavljanja koji odgovara veličini umnoženog odsječka DNA za lokus ms01. Npr. odsječak DNA veličine 182 pb predstavlja 3 ponavljanja
4. pod lokus ms01 se napiše broj ponavljanja. U ovom primjeru napiše se 3
5. postupak se ponovi za sve lokuse te se dobije genotip uzorka koji je slijed od 17 brojeva, a u ovom primjeru to je: **3 6 8 7 15 6 6 4 6 7 5 13 2 7 3 9 11** (Slika 14.).

oznaka uzorka	ms 01	ms 03	ms 07	ms 12	ms 20	ms 21	ms 22	ms 26	ms 30	ms 36	ms 23	ms 24	ms 27	ms 28	ms 31	ms 33	ms 34	oznaka MLVA genotipa
16	3	6	8	7	15	6	6	4	6	7	5	13	2	7	3	9	11	CbCR001
41	3	6	8	7	15	6	6	4	6	7		13	2	7	3	9	9	CbCR002
43	3	6	8	7	15	6	6	4	6	7		13	2	7	3	9	9	CbCR002

genotip

**Slika 14.** Primjer jednog genotipa. Genotip uzorka 16 označen je crvenom bojom, a čine ga brojevi 3 6 8 7 15 6 6 4 6 7 5 13 2 7 3 9 11.

### 3.2.6. Primer-BLAST

Dobiveni rezultati PCR reakcija za neke lokuse nisu se poklapali s rezultatima u referenci Arricau-Bouvery i sur. (2006.) zbog čega je u internetskim bazama podataka nađeno koje odsječke DNA umnažaju početnice korištene u metodi MLVA. Na internetskoj stranici [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastAlnAd](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastAlnAd) nalazi se alat Primer-BLAST. U kućicu pod **Primer Parameters Use my own forward primer (5'→3' on plus strand)** upiše se sekvenca forward početnice, a pod **Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand)** upiše se sekvenca reverse početnice za određeni lokus. Pod **Primer Pair Specificity Checking Parameters Database** u padajućem izborniku se izabere **Genome (chromosomes from all organisms)**, a pod **Organism** se izabere **Coxiella group (taxid:118968)** te se klikne mišem na **Get Primers** na dnu stranice (Slika 15.). Nakon toga se

otvori stranica sa sojevima bakterije *C. burnetii* za koje u bazi podataka postoje sekvence genoma ili dijelova genoma te veličina i naziv odsječka DNA koji je omeđen upisanim početnicama.

**Primer-BLAST**  
A tool for finding specific primers

► NCBI/Primer-BLAST: Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST). [more...](#) [Tips for finding specific primers](#)

**PCR Template**  
Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred) [Clear](#)  
Or, upload FASTA file [Browse...](#)

**Range**  
Forward primer  From  To  [Clear](#)  
Reverse primer   [Clear](#)

**Primer Parameters**

Use my own forward primer (5'→3' on plus strand)  [Clear](#)  
Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand)  [Clear](#)

PCR product size Min  Max

# of primers to return

Primer melting temperatures (T<sub>m</sub>) Min  Opt  Max  Max T<sub>m</sub> difference

**Exon/intron selection**  
A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section

Exon junction span

Exon junction match Exon at 5' side  Exon at 3' side   
Minimal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction

Intron inclusion ☐ Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA

Intron length range Min  Max

**Primer Pair Specificity Checking Parameters**

Specificity check ☒ Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template

Database

Organism   
Enter an organism name, taxonomy id or select from the suggestion list as you type.

Exclusion (optional) ☐ Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix) ☐ Exclude uncultured/environmental sample sequences

Entrez query (optional)

Primer specificity stringency Primer must have at least  total mismatches to unintended targets, including at least  mismatches within the last  bps at the 3' end.  
Ignore targets that have  or more mismatches to the primer.

Misprimed product size deviation

Splice variant handling ☐ Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input)

[Get Primers](#) ☐ Show results in a new window ☐ Use new graphic view

[Advanced parameters](#) **Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow**

**Slika 15.** Prikaz internetske stranice Primer-BLAST-a, alata za pronalaženje specifičnih početnica. Crveno su zaokružene stavke koje su mijenjane, a zelenim je zaokružena ikona Get Primers koja se klikne nakon što se upišu potrebni podatci. (Preuzeto s internetske stranice [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastAlnAd](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastAlnAd)).

### 3.2.7. Statistička analiza

Dobiveni genotipovi obrađeni su na internetskoj stranici <http://www.miru-vntrplus.org> gdje su svrstani u skupine prema metodi za sparivanje skupina na temelju prosječnih vrijednosti (*Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages*, UPGMA) i konstruiran je dendogram.

Diskriminatorna moć metode MLVA izračunata je pomoću Hunter-Gaston-ovog indeksa raznolikosti (*Hunter-Gaston Diversity Index*, HGDI) (Hunter i Gaston, 1988.) u kojem vrijednost D izražava vjerojatnost da dva uzorka, nasumično odabrana iz testirane populacije, pripadaju različitim tipovima. Na primjer: ako se za D dobije vrijednost 0,746 to znači da će dva uzorka nasumično odabrana iz testirane populacije u 74,6% slučajeva pripadati različitim tipovima. Formula za izračunavanje HGDI je sljedeća:

$$D=1-\frac{1}{N(N-1)}\sum_{j=1}^s n_j(n_j-1)$$

Gdje je:

$N$  = ukupan broj testiranih uzoraka

$s$  = broj različitih tipova

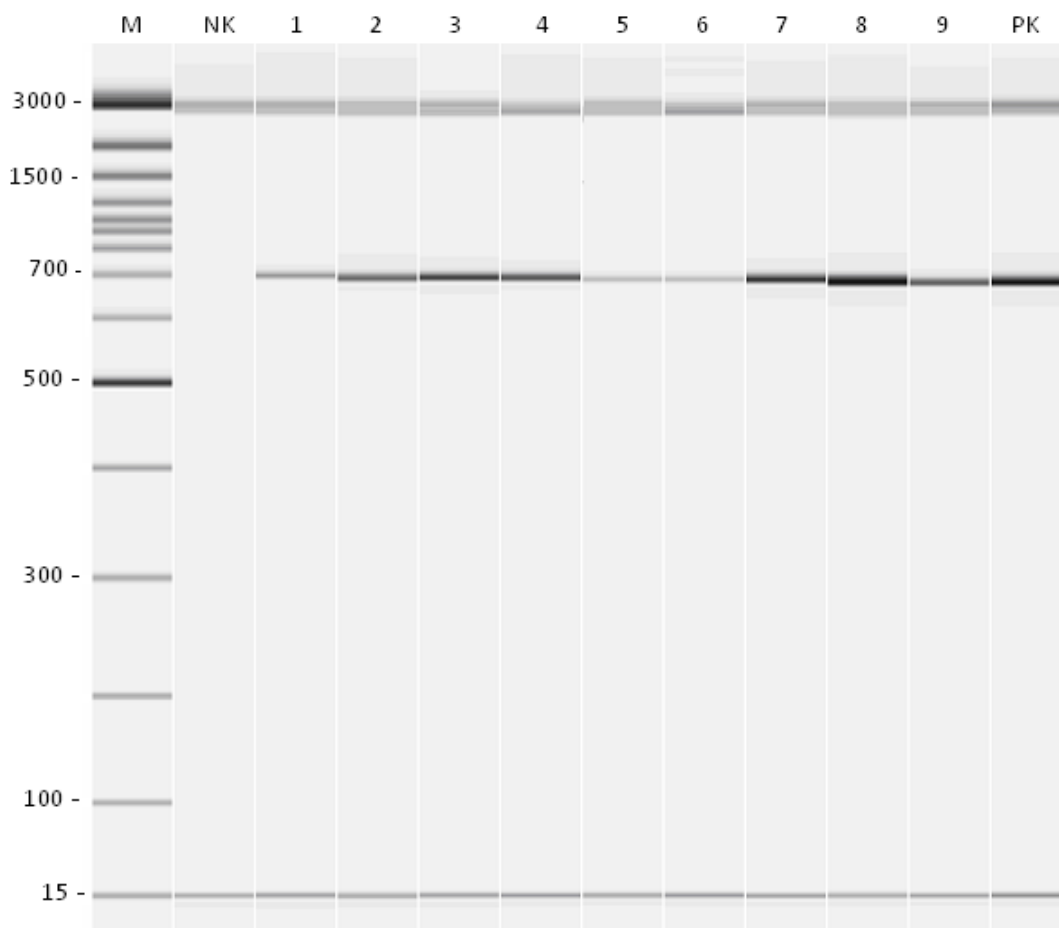
$n_j$  = broj uzoraka koji pripadaju točno određenom tipu



#### ***4.   REZULTATI***

#### 4.1. Utvrđivanje pripadnosti vrsti *Coxiella burnetii* metodom TRANS ½ PCR

Metodom TRANS ½ PCR ukupno je pretraženo 2636 uzoraka, a prisustvo DNA bakterije *C. burnetii* je dokazano u 231 uzorku (Slika 16.). Prisustvo DNA bakterije je dokazano u krvi, obriscima rodnice, organima pobačenih plodova, mlijeku i posteljicama različitih životinja. U ljudi je pretraživana krv, a DNA bakterije je dokazana u šest krvi. Ukupno je pretražena 1881 krv koja je metodom RVK bila pozitivna na Q-groznicu no u jako malom postotku (7,7%) odnosno u 145 krvi je utvrđeno prisustvo DNA bakterije *C. burnetii* (Tablica 15.; Tablica 16.; Tablica 17.)



**Slika 16.** Dokazivanje DNA bakterije *C. burnetii* metodom TRANS ½ PCR. M – marker; NK – negativna kontrola; 1 – 9 – uzorci pozitivni na DNA bakterije *C. burnetii* (odsječci DNA veličine 687 pb); PK – pozitivna kontrola (*C. burnetii* Nine Mile I). (Prikaz gela dobivenog kapilarnom elektroforezom pomoću uređaja QIAxcel (Qiagen, SAD))

**Tablica 15.** Vrsta uzoraka pretraženih metodom TRANS ½ PCR.

Vrsta uzorka	Broj pretraženih uzoraka	Broj pozitivnih uzoraka
krv	1881	145
obrisak rodnice	296	43
organi pobačenog ploda	255	30
mlijeko	12	11
posteljica	152	2
lohije	37	0
feces	3	0
<b>UKUPNO</b>	<b>2636</b>	<b>231</b>

**Tablica 16.** Broj uzoraka pretraženih metodom TRANS ½ PCR po životinjama.

Vrsta životinje	Vrsta uzorka	Broj pretraženih uzoraka	Broj pozitivnih uzoraka	Broj pretraženih uzoraka po vrsti životinje	Broj pozitivnih uzoraka po vrsti životinje (udio pozitivnih uzoraka)
govedo	feces	3	0	551	18 (3,3%)
	lohije	37	0		
	mlijeko sirovo	3	2		
	obrisak rodnice	223	13		
	organi ploda	149	2		
	posteljica	136	1		
koza	mlijeko sirovo	9	9	131	63 (48,1%)
	obrisak rodnice	49	30		
	organi ploda	67	24		
	posteljica	6	0		
ovca	obrisak rodnice	23	0	71	5 (7,0%)
	organi ploda	39	4		
	posteljica	9	1		
kobila	obrisak rodnice	1	0	2	0
	posteljica	1	0		
<b>UKUPNO</b>				<b>755</b>	<b>86</b>

**Tablica 17.** Broj uzoraka krvi pretraženih metodom TRANS ½ PCR.

Podrijetlo uzorka	Broj pretraženih krvi	Broj pozitivnih krvi
čovjek	186	6
govedo	600	3
konj	43	19
koza	496	82
ovca	556	35
<b>UKUPNO</b>	<b>1881</b>	<b>145</b>

Uzorci za koje se utvrdilo da su pozitivni, dostavljeni su iz 10 županija: Splitsko-dalmatinske (71 uzorak iz 10 uzgoja), Zadarske (56 uzoraka iz 8 uzgoja i 1 čovjeka), Ličko-senjske (34 iz 4 uzgoja), Šibensko-kninske (29 iz 4 uzgoja), Koprivničko-križevačke (13 iz 1 uzgoja), Zagrebačke (7 iz 2 uzgoja), Osječko-baranjske (5 iz 2 uzgoja), Bjelovarsko-bilogorske (2 iz 2 uzgoja), Vukovarsko-srijemske (2 iz 2 uzgoja) i Sisačko-moslavačke (1 iz 1 uzgoja) (Tablica 18.). DNA bakterije *C. burnetii* smo dokazali i u 11 uzoraka iz Bosne i Hercegovine iz jednog uzgoja ovaca i u četvero ljudi.

**Tablica 18.** Županije iz kojih su dostavljeni uzorci pozitivni na DNA bakterije *C. burnetii*, podrijetlo i vrsta uzoraka i broj pozitivnih uzoraka.

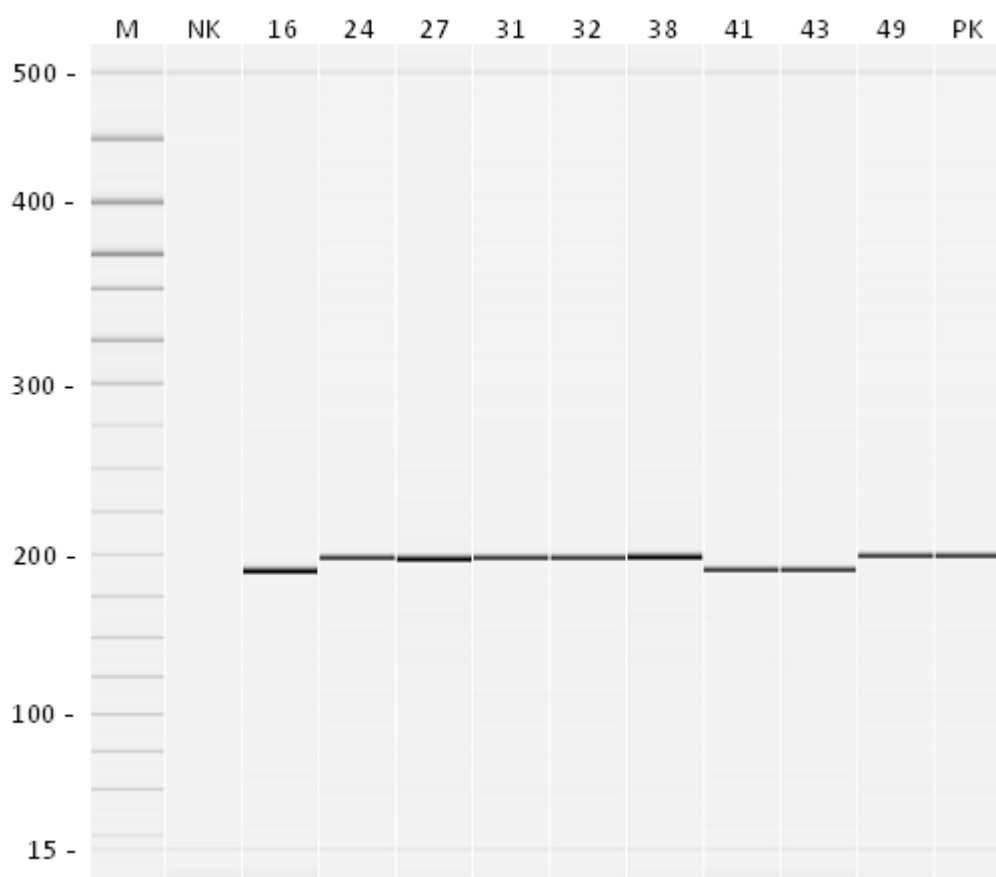
Županija	Oznaka uzgoja ili čovjek	Podrijetlo uzorka	Vrsta uzorka	Broj pozitivnih uzoraka	Broj pozitivnih uzoraka po uzgoju	Ukupan broj pozitivnih uzoraka u županiji
Bjelovarsko - bilogorska	uzgoj1	konj	krv	1	1	2
	uzgoj2	govedo	krv	1	1	
Koprivničko-križevačka	uzgoj1	govedo	mlijeko	2	13	13
		govedo	obrisak rodnice	11		
Ličko - senjska	uzgoj1	koza	organi ploda	1	1	34
	uzgoj2	koza	organi ploda	2	9	
		koza	krv	7		
	uzgoj3	ovca	krv	19	19	
	uzgoj4	koza	organi ploda	2	5	
		koza	krv	3		
Osječko-baranjska	uzgoj1	govedo	obrisak rodnice	4	4	5
	uzgoj2	govedo	obrisak rodnice	1	1	
Sisačko-moslavačka	uzgoj1	govedo	posteljica	1	1	1
Splitsko - dalmatinska	uzgoj1	koza	krv	6	6	71
	uzgoj2	konj	krv	18	18	
	uzgoj3	ovca	krv	8	21	
		koza	krv	13		
	uzgoj4	koza	krv	5	5	
	uzgoj5	govedo	obrisak rodnice	1	1	
	uzgoj6	ovca	krv	2	2	
	uzgoj7	koza	krv	6	6	
		koza	organi ploda	5	5	
	uzgoj8	koza	organi ploda	2	2	
	uzgoj9	koza	krv	3	3	
	uzgoj10	ovca	posteljica	1	2	
ovca		organi ploda	1			
Šibensko - kninska	uzgoj1	koza	organi ploda	13	19	29
		koza	krv	6		
	uzgoj2	koza	organi ploda	4	4	
	uzgoj3	koza	organi ploda	2	2	
	uzgoj4	ovca	organi ploda	4	4	
Vukovarsko-srijemska	uzgoj1	govedo	obrisak rodnice	1	1	2
	uzgoj2	govedo	posteljica	1	1	

Nastavak tablice s prethodne stranice.

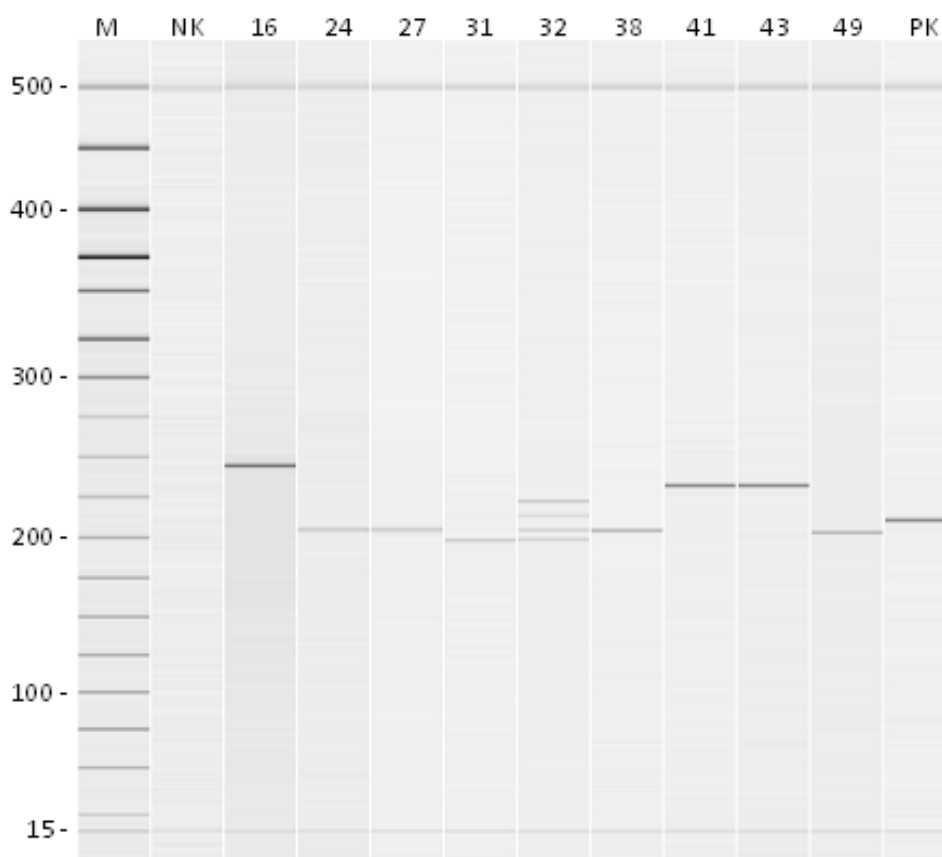
Županija	Oznaka uzgoja ili čovjek	Podrijetlo uzorka	Vrsta uzorka	Broj pozitivnih uzoraka	Broj pozitivnih uzoraka po uzgoju	Ukupan broj pozitivnih uzoraka u županiji
Zadarska	uzgoj1	koza	krv	5	5	56
	uzgoj2	koza	krv	1	1	
	čovjek	čovjek	krv	2	2	
	uzgoj4	koza	krv	4	4	
	uzgoj5	koza	krv	3	3	
	uzgoj6	koza	obrisak rodnice	25	32	
		koza	mlijeko	7		
	uzgoj7	koza	obrisak rodnice	5	7	
		koza	mlijeko	2		
	uzgoj8	ovca	organi ploda	2	2	
Zagrebačka	uzgoj1	govedo	krv	3	3	7
	uzgoj2	govedo	organi ploda	4	4	
BIH	uzgoj1	ovca	krv	7	7	11
	čovjek1	čovjek	krv	1	1	
	čovjek2	čovjek	krv	1	1	
	čovjek3	čovjek	krv	1	1	
	čovjek4	čovjek	krv	1	1	

## 4.2. Metoda MLVA

Za genotipizaciju metodom MLVA odabrano je 49 uzoraka (izoliranih DNA) u kojih je metodom TRANS $\frac{1}{2}$  PCR dokazano prisustvo DNA bakterije *C. burnetii*. Za svaki uzorak DNA rađena je po jedna reakcija PCR za svaki lokus MLVA. Nakon PCR-a, veličina umnoženih odsječaka DNA bila je određena kapilarnom elektroforezom pomoću uređaja QIAxcel. Na temelju dobivenih veličina umnoženih odsječaka DNA pomoću Tablice 14. određen je broj ponavljanja za svaki lokus. Na Slici 17. je prikaz gela dobivenog kapilarnom elektroforezom pomoću uređaja QIAxcel za lokus ms01, a na Slici 18. je prikaz za lokus ms34.



**Slika 17.** Određivanje broja ponavljanja na lokusu ms01. M – marker; NK – negativna kontrola; 16, 41, 43 – uzorci s odsječcima DNA veličine 182 pb (3 ponavljanja); ostali uzorci s odsječcima DNA veličine 198 pb (4 ponavljanja); PK – pozitivna kontrola (*C. burnetii* Nine Mile I). (Prikaz gela dobivenog kapilarnom elektroforezom pomoću uređaja QIAxcel (Qiagen, SAD))



**Slika 18.** Određivanje broja ponavljanja na lokusu ms34. M – marker; NK – negativna kontrola; 16 – 49 - uzorci; PK – pozitivna kontrola (*C. burnetii* Nine Mile I). (Prikaz gela dobivenog kapilarnom elektroforezom pomoću uređaja QIAxcel (Qiagen, SAD))

Prvi rezultati PCR reakcija za neke lokuse MLVA nisu se poklapali s rezultatima u referenci Arricau-Bouvery i sur. (2006.). Kada je korištena DNA referentnog soja Nine Mile I veličina umnoženog odsječka DNA u reakciji PCR za lokus ms30 bila je oko 305 pb, dok je u referenci 215 pb. Isto tako za lokus ms31 PCR reakcijom je dobiven odsječak DNA veličine oko 285 pb dok je u referenci navedeno 185 pb, a za lokus ms36 je dobiven odsječak DNA veličine oko 480 pb dok je u referenci navedeno 447 pb (Tablica 19.). Dobiveni rezultati su se poklapali s rezultatima koje su dobili Roest i suradnici (2011.). Da bi se potvrdila točnost dobivenih rezultata te rezultata Roesta i suradnika (2011.) pretražene su baze podataka na internetu pomoću alata Primer-BLAST. U bazama podataka na internetu provjeravano je koje su veličine odsječaka DNA genoma Nine Mile I koji se umnože korištenjem početnica za pojedine lokuse.



**Tablica 19.** Usporedba dobivenih veličina odsječaka DNA za referentni soj Nine Mile I za lokuse ms30, ms31 i ms36 s različitim referencama.

lokus	veličina odsječaka DNA za referentni soj Nine Mile I (pb)		
	rezultati Arricau-Bouvery i sur., 2006.	dobiveni rezultati	rezultati Roest i sur., 2011.
ms30	215	~ 305	306
ms31	182	~ 285	285
ms36	447	~ 480	477

#### 4.2.1. Primer-BLAST

Pretraživanjem alatom Primer-BLAST za lokuse ms31 i ms36 dobiveni su podaci koji su se podudarali s dobivenim rezultatima, a time i s rezultatima Roesta i suradnika (2011.). Veličine odsječaka DNA su 285 pb za lokus ms31 i 477 pb za lokus ms36 za ref. soj Nine Mile bakterije *C. burnetii*. Na Slici 19. su rezultati pretraživanja alatom Primer-BLAST s početnicama za lokus ms30. Iz rezultata se vidi da te početnice u genomu soja bakterije *C. burnetii* Nine Mile faze I RSA493 umnažaju odsječak DNA veličine 306 pb (6 ponavljanja) što odgovara dobivenim rezultatima te rezultatima prikazanim u radu Roesta i suradnika (2011.). No iz rezultata se vidi i to da te početnice u genomu soja vrste *C. burnetii* RSA 331 umnažaju odsječak DNA veličine 297 pb, što ne bi smjelo biti moguće s obzirom da je veličina ponavljajućeg slijeda 18 pb. Kako su u radu za lokus ms30 za neke uzorke umnoženi odsječci bili veličine 297 pb njima je dodijeljeni broj ponavljanja bio 5,5.

```

>NC\_010117.1 Coxiella burnetii RSA 331 chromosome, complete genome

product length = 297
Features associated with this product:
  dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase, E2 compo...

Forward primer  1          ATTCCTCGACATCAACGTCTT  22
Template        1428521  ..... 1428542

Reverse primer  1          AGTCGATTTGGAAACGGATAAA  22
Template        1428817  ..... 1428796

>NC\_009727.1 Coxiella burnetii Dugway 5J108-111 chromosome, complete genome

product length = 306
Features associated with this product:
  dihydrolipoamide succinyltransferase component \(E2\) of 2-...

Forward primer  1          ATTCCTCGACATCAACGTCTT  22
Template        575378  ..... 575357

Reverse primer  1          AGTCGATTTGGAAACGGATAAA  22
Template        575073  ..... 575094

>NC\_002971.3 Coxiella burnetii RSA 493 chromosome, complete genome

product length = 306
Features associated with this product:
  dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase, E2 compo...

Forward primer  1          ATTCCTCGACATCAACGTCTT  22
Template        1350938  ..... 1350959

Reverse primer  1          AGTCGATTTGGAAACGGATAAA  22
Template        1351243  ..... 1351222

```

**Slika 19.** Prikaz rezultata pretraživanja pomoću alata Primer-BLAST s početnicama za lokus ms30. (Preuzeto s internetske stranice [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastAlnAd](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastAlnAd)).

#### 4.2.2. Tablica broja ponavljanja

Prema dobivenim rezultatima PCR-a za MLVA, rezultatima Roesta i suradnika (2011.), te rezultatima Primer-BLAST-a konstruirana je nova tablica za određivanje broja ponavljanja za pojedine lokuse (Tablica 20.). Tablica 20. se od Tablice 14. konstruirane prema referenci Arricau-Bouvery i sur. (2006.) razlikuje na tri lokusa. Za lokus ms30 je za referentni soj Nine Mile naveden odsječak DNA veličine 306 pb koji predstavlja 6

ponavljanja. Za lokus ms36 je naveden odsječak veličine 477 pb (7 ponavljanja), a za lokus ms31 odsječak veličine 285 pb (5 ponavljanja). U tablici su navedeni lokusi i odsječci DNA obojeni zelenom bojom. Na temelju veličina tih odsječaka DNA izračunate su i ostale veličine odsječaka za određene brojeve ponavljanja.

**Tablica 20.** Tablica broja ponavljanja. Veličinama odsječka DNA pridruženi su brojevi ponavljanja. Crvenom bojom označene su veličine odsječka DNA koje su dobili Arricau-Bouvery i suradnici (2006.) za soj Nine Mile I, a plavom bojom veličine odsječka DNA koje su za ostale sojeve dobili drugi istraživači. Zelenom bojom su označene veličine odsječka DNA za soj Nine Mile I dobivene u ovom radu.

Ponavljanja	PANEL 1											PANEL 2						
	ms01 (16bp)	ms03 (12bp)	ms07 (126bp)	ms12 (126bp)	ms20 (18bp)	ms21 (12bp)	ms22 (11bp)	ms26 (9bp)	ms30 (18bp)	ms36 (9bp)	ms23 (7bp)	ms24 (7bp)	ms27 (6bp)	ms28 (6bp)	ms31 (7bp)	ms33 (7bp)	ms34 (6bp)	
1	150	157	230	192	150	150	191	100	216	420	108	162	258	246	257	206	186	
2	166	169	356	318	168	162	202	109	234	429	115	169	264	252	264	213	192	
3	182	181	482	444	186	174	213	118	252	438	122	176	270	258	271	220	198	
4	198	193	608	570	204	186	224	127	270	447	129	183	276	264	278	227	204	
5	214	205	734	696	222	198	235	136	288	456	136	190	282	270	285	234	210	
6	230	217	860	822	240	210	246	145	306	465	143	197	288	276	292	241	216	
7	246	229	986	948	258	222	257	154	324	477	150	204	294	282	299	248	222	
8	262	241	1112	1074	276	234	268	163	342	486	157	211	300	288	306	255	228	
9	278	253	1238	1200	294	246	279	172	360	495	164	218	306	294	313	262	234	
10	294	265	1364	1326	312	258	290	181	378	504	171	225	312	300	320	269	240	
11	310	277	1490	1452	330	270	301	190	396	513	178	232	318	306	327	276	246	
12	326	289	1616	1578	348	282	312	199	414	522	185	239	324	312	334	283	252	
13	342	301	1742	1704	366	294	323	208	432	531	192	246	330	318	341	290	258	
14	358	313	1868	1830	384	306	334	217	450	540	199	253	336	324	348	297	264	
15	374	325	1994	1956	402	318	345	226	468	549	206	260	342	330	355	304	270	
16	390	337	2120	2082	420	330	356	235	486	558	213	267	348	336	362	311	276	
17	406	349	2246	2208	438	342	367	244	504	567	220	274	354	342	369	318	282	
18	422	361	2372	2334	456	354	378	253	522	576	227	281	360	348	376	325	288	
19	438	373	2498	2460	474	366	389	262	540	585	234	288	366	354	383	332	294	
20	454	385	2624	2586	492	378	400	271	558	594	241	295	372	360	390	339	300	
21	470	397	2750	2712	510	390	411	280	576	603	248	302	378	366	397	346	306	
22	486	409	2876	2838	528	402	422	289	594	612	255	309	384	372	404	353	312	
23	502	421	3002	2964	546	414	433	298	612	621	262	316	390	378	411	360	318	
24	518	433	3128	3090	564	426	444	307	630	630	269	323	396	384	418	367	324	
25	534	445	3254	3216	582	438	455	316	648	639	276	330	402	390	425	374	330	
26	550	457	3380	3342	600	450	466	325	666	648	283	337	408	396	432	381	336	

#### 4.2.3. MLVA genotipovi

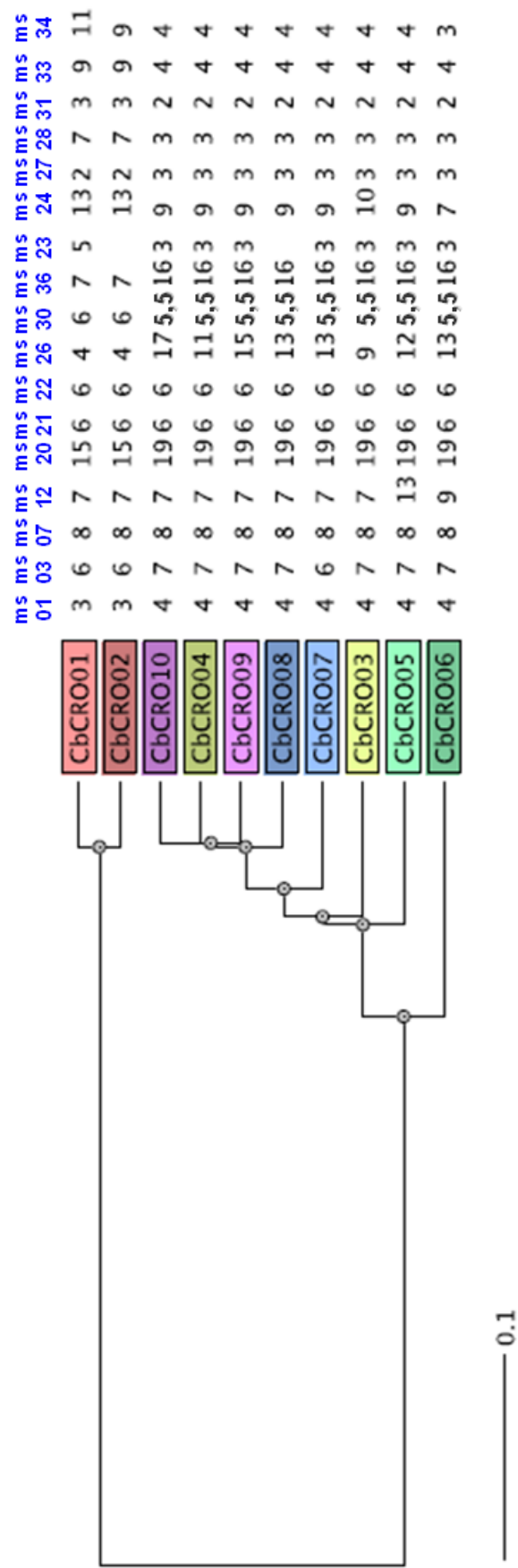
Za genotipizaciju metodom MLVA izabrano je 49 uzoraka (izoliranih DNA) no reakcije MLVA PCR-a uspjele su samo za 15 uzoraka. Uspjela genotipizacija znači da je za uzorak dobiven PCR produkt za 16 ili za svih 17 lokusa koji se koriste u MLVA genotipizaciji. Kod ostalih uzoraka nije bilo PCR produkta za 6 ili više lokusa. U Tablici 21. prikazani su uzorci, vrsta životinje, godina izolacije DNA, županija iz koje je uzorak dostavljen te MLVA genotip. Način označavanja MLVA genotipa je preuzet od Roesta i suradnika (2011.): „CbCROxx“ gdje „Cb“ znači *C. burnetii*, „CRO“ označava zemlju podrijetla (Hrvatska – *Croatia*), a xx je broj genotipa npr. CbCRO01 je prvi utvrđeni genotip. PCR za lokus ms23 nije dao nikakav PCR produkt za 5 od 15 uzoraka. U slučajevima kad se dva uzorka poklapaju u svim lokusima, a lokus ms23 je kod jednog imao PCR produkt a kod drugog nije, uzorci su svrstani u isti genotip. Na Slici 20. prikazan je dendogram dobiven UPGMA metodom za dobivenih 10 genotipova, a na Slici 21. prikazan je razmještaj dobivenih genotipova po Hrvatskoj.

U jedan od genotipova svrstano je samo 14 uzoraka. Uzorak 32 nije bilo moguće svrstati u određeni genotip jer se kod njega se na lokusima ms12, ms26 i ms23 javljaju dva, a na lokusima ms24 i ms34 (Slika 18.) četiri benda u elektroforezi nakon PCR reakcije. Brojevi ponavljanja za pojedine lokuse za uzorak 32 prikazani su na Slici 22. Uz uzorak 32 prikazan je i uzorak 31 jer mu je najbližnji po brojevima ponavljanja na svim lokusima.

Tablica 21. MLVA genotipovi bakterije *C. burnetii* u Hrvatskoj.

Oznaka uzorka	Godina	Županija	Vrsta životinje	Vrsta uzorka	Lokusi																						MLVA genotip
					Panel 1												Panel 2										
					ms 01	ms 03	ms 07	ms 12	ms 20	ms 21	ms 22	ms 26	ms 30	ms 36	ms 23	ms 24	ms 27	ms 28	ms 31	ms 33	ms 34						
16	2006.	Osječko-baranjska	govedo	obrisak rodnice	3	6	8	7	15	6	6	4	6	7	5	13	2	7	3	9	11	CbCRO01					
41	2011.	Osječko-baranjska	govedo	obrisak rodnice	3	6	8	7	15	6	6	4	6	7		13	2	7	3	9	9	CbCRO02					
43	2012.	Koprivničko-križevačka	govedo	mljeko	3	6	8	7	15	6	6	4	6	7		13	2	7	3	9	9	CbCRO02					
27*	2010.	Šibensko - kninska	koza	organi ploda	4	7	8	7	19	6	6	9	5,5	16	3	10	3	3	2	4	4	CbCRO03					
33*	2010.	Šibensko - kninska	koza	organi ploda	4	7	8	7	19	6	6	9	5,5	16	3	10	3	3	2	4	4	CbCRO03					
42	2012.	Zadarska	koza	obrisak rodnice	4	7	8	7	19	6	6	11	5,5	16	3	9	3	3	2	4	4	CbCRO04					
38	2011.	Zagrebačka	govedo	organi ploda	4	7	8	13	19	6	6	12	5,5	16	3	9	3	3	2	4	4	CbCRO05					
31	2010.	Ličko - senjska	koza	organi ploda	4	7	8	9	19	6	6	13	5,5	16	3	7	3	3	2	4	3	CbCRO06					
49	2012.	Zadarska	ovca	organi ploda	4	6	8	7	19	6	6	13	5,5	16	3	9	3	3	2	4	4	CbCRO07					
48	2012.	Splitško - dalmatinska	ovca	organi ploda	4	7	8	7	19	6	6	13	5,5	16		9	3	3	2	4	4	CbCRO08					
30	2010.	Splitško - dalmatinska	koza	organi ploda	4	7	8	7	19	6	6	15	5,5	16	3	9	3	3	2	4	4	CbCRO09					
36	2010.	Šibensko - kninska	koza	organi ploda	4	7	8	7	19	6	6	15	5,5	16		9	3	3	2	4	4	CbCRO09					
24	2008.	Ličko-senjska	koza	organi ploda	4	7	8	7	19	6	6	17	5,5	16	3	9	3	3	2	4	4	CbCRO10					
40	2011.	Šibensko - kninska	ovca	organi ploda	4	7	8	7	19	6	6	17	5,5	16		9	3	3	2	4	4	CbCRO10					

\*uzorci pripadaju istom uzgoju



**Slika 20.** Dendrogram dobiven UPGMA metodom za dobivenih 10 genotipova bakterije *C. burnetii* u Hrvatskoj. Svaki genotip je označen drugom bojom. Lokusi su označeni plavom bojom.



**Slika 21.** Razmještaj MLVA genotipova bakterije *C. burnetii* po Hrvatskoj.



Oznaka uzorka	Datum urudžb.	Datum izol.	Županija	Vet. ambul.	Vlasnik	Vrsta živ.	Vrsta uzorka	ms 01	ms 03	ms 07	ms 12	ms 20	ms 21	ms 22	ms 26	ms 30	ms 36	ms 23	ms 24	ms 27	ms 28	ms 31	ms 33	ms 34
32	25.2. 2010.	2.3. 2010.	Ličko - senjska	VA1	Vlasnik1	koza	organi ploda	4	7	8	9	19	6	6	13	5,5	16	3	7	3	3	2	4	3
31	25.2. 2010.	2.3. 2010.	Ličko - senjska	VA1	Vlasnik2	koza	organi ploda	4	7	8	9	19	6	6	13	5,5	16	3	7	3	3	2	4	3

**Slika 22.** Prikaz broja ponavljanja za uzorke 32 i 31. Za uzorak 32 se na lokusima ms12, ms26 i ms23 javljaju dva različita broja ponavljanja (dva benda u elektroforezi), a za lokus ms24 i ms34 četiri različita broja ponavljanja (četiri benda u elektroforezi).

**Datum urudžb.** – datum kad je uzorak zaprimljen u Laboratorij;

**Datum izol.** – datum izolacije DNA iz uzorka;

**Vet. ambul.** – veterinarska ambulanta (VA1 – veterinarska ambulanta 1 – ukazuje na to da je uzorke poslala ista ambulanta);

**Vlasnik1 i Vlasnik2** – ukazuje na to da se radi o različitim vlasnicima;

**Žutom bojom** označeni su brojevi ponavljanja koji se podudaraju za uzorke 31 i 32, a česti su i u drugih uzoraka;

**Crvenom bojom** označeni su brojevi ponavljanja koji se podudaraju za uzorke 31 i 32, a u drugih uzoraka se ne javljaju;

**Plavom bojom** označeni su brojevi ponavljanja koji se podudaraju za uzorke 31 i 32, a javljaju se i u drugih uzoraka;

**Zelenom bojom** označeni su brojevi ponavljanja koji se javljaju samo kod uzorka 32;

**Sivom bojom** označeni su brojevi ponavljanja koji se javljaju za uzorak 32, ali i u drugih uzoraka.

Genotipovi bakterije *C. burnetii* u Hrvatskoj dobiveni korištenjem 17 lokusa mogli bi se razlikovati korištenjem samo 5 lokusa: ms03, ms12, ms26, ms24 i ms34 (Tablica 22.).

**Tablica 22.** MLVA genotipovi bakterije *C. burnetii* dobiveni korištenjem samo 5 lokusa (ms03, ms12, ms26, ms24 i ms34).

Redni broj	Oznaka uzorka	Lokusi					MLVA genotip
		ms 03	ms 12	ms 26	ms 24	ms 34	
1	16	6	7	4	13	11	CbCRO01
2	41	6	7	4	13	9	CbCRO02
3	43	6	7	4	13	9	CbCRO02
4	27	7	7	9	10	4	CbCRO03
5	33	7	7	9	10	4	CbCRO03
6	42	7	7	11	9	4	CbCRO04
7	38	7	13	12	9	4	CbCRO05
8	31	7	9	13	7	3	CbCRO06
9	49	6	7	13	9	4	CbCRO07
10	48	7	7	13	9	4	CbCRO08
11	30	7	7	15	9	4	CbCRO09
12	36	7	7	15	9	4	CbCRO09
13	24	7	7	17	9	4	CbCRO10
14	40	7	7	17	9	4	CbCRO10

Kad bi se za genotipizaciju koristili samo lokusi panela 1, 14 uzoraka bi bilo svrstano u 9 genotipova (Tablica 23). Genotipovi dobiveni genotipizacijom korištenjem lokusa panela 1 uglavnom se poklapaju s genotipovima dobiveni genotipizacijom sa svih 17 lokusa, osim genotipova CbCRO01 i CbCRO02 koji se korištenjem samo lokusa panela 1 ne mogu razlikovati.

**Tablica 23.** MLVA genotipovi bakterije *C. burnetii* dobiveni korištenjem lokusa panela 1.

Redni broj	Oznaka uzorka	Lokusi										MLVA genotip	Genotipovi panela 1
		ms 01	ms 03	ms 07	ms 12	ms 20	ms 21	ms 22	ms 26	ms 30	ms 36		
1	16	3	6	8	7	15	6	6	4	6	7	CbCRO01	Genotip 1
2	41	3	6	8	7	15	6	6	4	6	7	CbCRO02	
3	43	3	6	8	7	15	6	6	4	6	7	CbCRO02	
4	27	4	7	8	7	19	6	6	9	5,5	16	CbCRO03	Genotip 2
5	33	4	7	8	7	19	6	6	9	5,5	16	CbCRO03	
6	42	4	7	8	7	19	6	6	11	5,5	16	CbCRO04	Genotip 3
7	38	4	7	8	13	19	6	6	12	5,5	16	CbCRO05	Genotip 4
8	31	4	7	8	9	19	6	6	13	5,5	16	CbCRO06	Genotip 5
9	49	4	6	8	7	19	6	6	13	5,5	16	CbCRO07	Genotip 6
10	48	4	7	8	7	19	6	6	13	5,5	16	CbCRO08	Genotip 7
11	30	4	7	8	7	19	6	6	15	5,5	16	CbCRO09	Genotip 8
12	36	4	7	8	7	19	6	6	15	5,5	16	CbCRO09	
13	24	4	7	8	7	19	6	6	17	5,5	16	CbCRO10	Genotip 9
14	40	4	7	8	7	19	6	6	17	5,5	16	CbCRO10	

Kad bi se za genotipizaciju koristili lokusi panela 1 bez lokusa ms26 koji ima najveći broj različitih alela, genotipizacijom 14 uzoraka dobilo bi se 5 genotipova (Tablica 24.). Genotipovi CbCRO01 i CbCRO02 bi bili jedan genotip, genotipovi CbCRO03 i CbCRO04 bi bili jedan genotip i genotipovi CbCRO08, CbCRO09 i CbCRO10 bi bili jedan genotip. Genotipovi CbCRO05, CbCRO06 i CbCRO07 bi se i dalje razlikovali.

**Tablica 24** . MLVA genotipovi bakterije *C. burnetii* dobiveni korištenjem lokusa panela 1 bez lokusa ms 26.

Redni broj	Oznaka uzorka	Lokusi									MLVA genotip	Genotipovi panela 1 bez lokusa ms26
		ms 01	ms 03	ms 07	ms 12	ms 20	ms 21	ms 22	ms 30	ms 36		
1	16	3	6	8	7	15	6	6	6	7	CbCRO01	Genotip1
2	41	3	6	8	7	15	6	6	6	7	CbCRO02	
3	43	3	6	8	7	15	6	6	6	7	CbCRO02	
4	27	4	7	8	7	19	6	6	5,5	16	CbCRO03	Genotip 2
5	33	4	7	8	7	19	6	6	5,5	16	CbCRO03	
6	42	4	7	8	7	19	6	6	5,5	16	CbCRO04	
7	38	4	7	8	13	19	6	6	5,5	16	CbCRO05	Genotip 3
8	31	4	7	8	9	19	6	6	5,5	16	CbCRO06	Genotip 4
9	49	4	6	8	7	19	6	6	5,5	16	CbCRO07	Genotip 5
10	48	4	7	8	7	19	6	6	5,5	16	CbCRO08	Genotip 2
11	30	4	7	8	7	19	6	6	5,5	16	CbCRO09	
12	36	4	7	8	7	19	6	6	5,5	16	CbCRO09	
13	24	4	7	8	7	19	6	6	5,5	16	CbCRO10	
14	40	4	7	8	7	19	6	6	5,5	16	CbCRO10	

Genotipizacijom pomoću lokusa panela 2 dobilo bi se 5 genotipova (Tablica 25.). Genotipovi CbCRO01, CbCRO02, CbCRO03 i CbCRO06 bi se i dalje mogli razlikovati, dok bi genotipovi CbCRO04 i CbCRO05 bili isti genotip, i genotipovi CbCRO07, CbCRO08, CbCRO09 i CbCRO10 bi bili isti genotip.

**Tablica 25.** MLVA genotipovi bakterije *C. burnetii* dobiveni korištenjem lokusa panela 2.

Redni broj	Oznaka uzorka	Lokusi							MLVA genotip	Genotipovi panela 2
		ms 23	ms 24	ms 27	ms 28	ms 31	ms 33	ms 34		
1	16	5	13	2	7	3	9	11	CbCRO01	Genotip 1
2	41		13	2	7	3	9	9	CbCRO02	Genotip 2
3	43		13	2	7	3	9	9	CbCRO02	
4	27	3	10	3	3	2	4	4	CbCRO03	Genotip 3
5	33	3	10	3	3	2	4	4	CbCRO03	
6	42	3	9	3	3	2	4	4	CbCRO04	Genotip 4
7	38	3	9	3	3	2	4	4	CbCRO05	
8	31	3	7	3	3	2	4	3	CbCRO06	Genotip 5
9	49	3	9	3	3	2	4	4	CbCRO07	Genotip 4
10	48		9	3	3	2	4	4	CbCRO08	
11	30	3	9	3	3	2	4	4	CbCRO09	
12	36		9	3	3	2	4	4	CbCRO09	
13	24	3	9	3	3	2	4	4	CbCRO10	
14	40		9	3	3	2	4	4	CbCRO10	

#### 4.2.4. Usporedba genotipova bakterije *C. burnetii* s genotipovima u svijetu

Dobiveni MLVA genotipovi su uspoređeni s genotipovima bakterije *C. burnetii* objavljenim na internetskoj stranici <http://minisatellites.u-psud.fr> te s genotipovima objavljenim u radovima Roesta i suradnika (2011.) i Chmielewskog i suradnika (2009.).

Na internetskoj stranici <http://minisatellites.u-psud.fr> se nalaze dvije baze podataka s genotipovima bakterije *C. burnetii*: Coxiella2007 koju je kreiralo sveučilište iz Pariza (Paris Sud 11 university) i Coxiella2009\_Netherlands koju je kreirala nizozemska bolnica Canisius Wilhelmina Hospital.

## 4.2.4.1. Baza podataka Coxiella2007

U bazi podataka Coxiella2007 objavljeni su genotipovi bakterije *C. burnetii* na temelju 10 lokusa: ms03, ms12, ms21, ms22, ms30, ms36, ms27, ms28, ms31 i ms34. Kad se uzmu u obzir samo ti lokusi onda ne postoji razlika između dobivenih genotipova CbCRO03, CbCRO04, CbCRO08, CbCRO09 i CbCRO10. U Tablici 26. su prikazani dobiveni genotipovi i njima najbliži genotipovi iz baze podataka Coxiella2007. Princip rada s bazom podataka Coxiella2007 je takav da se upiše genotip koji se želi usporediti s genotipovima u bazi podataka nakon čega se na ekranu ispišu genotipovi najbliži upisanom genotipu. Na Slikama 23.-28. su rezultati pretraživanja baze podataka. U gornjem dijelu slike je genotip koji se uspoređuje, a na donjem dijelu slike je ispis najbližijih genotipova. Žutom bojom su označeni lokusi koji se razlikuju od lokusa upisanog genotipa. Usporedba genotipova bakterije *C. burnetii* u Hrvatskoj s najbližim genotipovima bakterije objavljenim u bazi podataka Coxiella2007 prikazana je na Slici 29. u obliku dendograma dobivenog metodom UPGMA.

**Tablica 26.** Usporedba dobivenih genotipova bakterije *C. burnetii* s genotipovima iz baze podataka Coxiella2007.

Genotip	Lokusi										Oznaka	Domaćin	Zemlja podrijetla
	ms 03	ms 12	ms 21	ms 22	ms 30	ms 36	ms 27	ms 28	ms 31	ms 34			
<b>CbCRO01</b>	6	7	6	6	6	7	2	7	3	11	—	—	Hrvatska
<b>CbCRO02</b>	6	7	6	6	6	7	2	7	3	9	—	—	
<b>CbCRO03, CbCRO04, CbCRO08, CbCRO09, CbCRO10</b>	7	7	6	6	5,5	16	3	3	2	4	—	—	
<b>CbCRO05</b>	7	13	6	6	5,5	16	3	3	2	4	—	—	
<b>CbCRO06</b>	7	9	6	6	5,5	16	3	3	2	3	—	—	
<b>CbCRO07</b>	6	7	6	6	5,5	16	3	3	2	4	—	—	
<b>CbB1</b>	6	7	6	6	6	7	2	7	3	9	Cb#021	govedo	Francuska
<b>CbC1</b>	6	7	6	6	6	7	2	7	3	10	Cb#015	ovca	
<b>CbB10</b>	6	7	6	6	6	7	2	7	3	7	Cb#029	govedo	
<b>Z 3351/92</b>	6	7	6	6	6	7	3	7	3	11	Cb#049	govedo	Njemačka
<b>CS_Bud</b>	7	7	6	6	5	17	3	3	2	3	Cb#045	govedo	Slovačka
<b>CS_R</b>	7	9	6	6	5	17	3	3	2	3	Cb#046	čovjek	Italija
<b>CS_Florian</b>	7	4	6	6	5	17	3	3	2	3	Cb#044	čovjek	Slovačka

Genotip		ms 03	ms 12	ms 21	ms 22	ms 30	ms 36	ms 27	ms 28	ms 31	ms 34
CbCRO01		6	7	6	6	6	7	2	7	3	11

key	Distance	strain	host	country	lon	lat	Same MLVA	m 0 3	m 1 2	m 2 2	m 3 3	m 3 3	m 2 2	m 3 3	m 2 3	m 3 3	
Cb#021	1	CbB1	Cattle	France	2.213749	46.227638	<a href="#">Full list of strains</a>	6	7	6	6	6	7	2	7	3	9
Cb#015	1	CbC1	Sheep	France	2.213749	46.227638	none	6	7	6	6	6	7	2	7	3	10
Cb#029	1	CbB10	Cattle	France	2.213749	46.227638	none	6	7	6	6	6	7	2	7	3	7
Cb#049	1	Z 3351/92	Cattle	Germany	10.451526	51.165691	none	6	7	6	6	6	7	3	7	3	11
Cb#050	2	Z 3749/92	Cattle	Germany	10.451526	51.165691	<a href="#">Full list of strains</a>	6	7	6	6	6	7	3	7	3	8
Cb#084	2	MIE 49					<a href="#">Full list of strains</a>	6	7	6	6	6	8	2	7	3	9
Cb#025	2	CbB4	Cattle	France	2.213749	46.227638	<a href="#">Full list of strains</a>	6	7	6	6	6	7	2	8	3	8
Cb#036	2	Z 2775/90	Cattle	Germany	10.451526	51.165691	none	6	7	6	6	6	7	3	7	3	9
Cb#039	2	Tiho 1	?	Germany	10.451526	51.165691	none	6	7	6	6	6	7	3	7	3	12
Cb#035	2	Dugway 5J108_111	Rodents	USA	-95.712891	37.090240	<a href="#">Full list of strains</a>	6	7	6	6	6	7	3	7	3	10

Slika 23. Usporedba genotipa CbCRO01 s genotipovima u bazi podataka Coxiella2007.

Genotip	ms 03	ms 12	ms 21	ms 22	ms 30	ms 36	ms 27	ms 28	ms 31	ms 34
CbCRO02	6	7	6	6	6	7	2	7	3	9

key	Distance	strain	host	country	lon	lat	Same MLVA	m 0 3	m 1 2	m 2 2	m 3 3	m 3 3	m 2 2	m 3 3	m 2 3	m 3 3	
Cb#021	0	CbB1	Cattle	France	2.213749	46.227638	<a href="#">Full list of strains</a>	6	7	6	6	6	7	2	7	3	9
Cb#084	1	MIE 49					<a href="#">Full list of strains</a>	6	7	6	6	6	8	2	7	3	9
Cb#015	1	CbC1	Sheep	France	2.213749	46.227638	none	6	7	6	6	6	7	2	7	3	10
Cb#029	1	CbB10	Cattle	France	2.213749	46.227638	none	6	7	6	6	6	7	2	7	3	7
Cb#036	1	Z 2775/90	Cattle	Germany	10.451526	51.165691	none	6	7	6	6	6	7	3	7	3	9
Cb#025	2	CbB4	Cattle	France	2.213749	46.227638	<a href="#">Full list of strains</a>	6	7	6	6	6	7	2	8	3	8
Cb#035	2	Dugway 5J108_111	Rodents	USA	-95.712891	37.090240	<a href="#">Full list of strains</a>	6	7	6	6	6	7	3	7	3	10
Cb#050	2	Z 3749/92	Cattle	Germany	10.451526	51.165691	<a href="#">Full list of strains</a>	6	7	6	6	6	7	3	7	3	8
Cb#039	2	Tiho 1	?	Germany	10.451526	51.165691	none	6	7	6	6	6	7	3	7	3	12

Slika 24. Usporedba genotipa CbCRO02 s genotipovima u bazi podataka Coxiella2007.

Genotipovi		ms 03	ms 12	ms 21	ms 22	ms 30	ms 36	ms 27	ms 28	ms 31	ms 34
<b>CbCRO03, CbCRO04, CbCRO08, CbCRO09, CbCRO10</b>		7	7	6	6	5,5	16	3	3	2	4

key	Distance	strain	host	country	lon	lat	Same MLVA	m s 0 3	m s 1 2	m s 2 1	m s 2 2	m s 3 0	m s 3 6	m s 2 7	m s 2 8	m s 3 1	m s 3 4
Cb#097	3	TOIE 85					Full list of strains	7	7	6	6	5,5	17	3	3	3	7
Cb#045	3	CS_Bud	Cattle	Slovak Republic			none	7	7	6	6	5	17	3	3	2	3
Cb#088	3	MIE 74					none	7	7	6	6	5,5	17	3	3	3	8
Cb#110	3	TIE 69					none	7	7	6	6	5,5	17	3	3	3	3
Cb#132	3	Tché					none	7	9	6	6	5,5	17	3	3	2	3
Cb#108	4	PIE 6					Full list of strains	7	7	6	6	5,5	8	2	3	3	3
Cb#044	4	CS_Florian	Human	Slovak Republic			none	7	4	6	6	5	17	3	3	2	3
Cb#046	4	CS_R	Human	Italy	12.567380	41.871940	none	7	9	6	6	5	17	3	3	2	3

**Slika 25.** Usporedba genotipova CbCRO03, CbCRO04, CbCRO08, CbCRO09, CbCRO010 s genotipovima u bazi podataka Coxiella2007.

Genotip	ms 03	ms 12	ms 21	ms 22	ms 30	ms 36	ms 27	ms 28	ms 31	ms 34
<b>CbCRO05</b>	7	13	6	6	5,5	16	3	3	2	4

key	Distance	strain	host	country	lon	lat	Same MLVA	m s 0 3	m s 1 2	m s 2 1	m s 2 2	m s 3 0	m s 3 6	m s 2 7	m s 2 8	m s 3 1	m s 3 4
Cb#132	3	Tché					none	7	9	6	6	5,5	17	3	3	2	3
Cb#044	4	CS_Florian	Human	Slovak Republic			none	7	4	6	6	5	17	3	3	2	3
Cb#045	4	CS_Bud	Cattle	Slovak Republic			none	7	7	6	6	5	17	3	3	2	3
Cb#046	4	CS_R	Human	Italy	12.567380	41.871940	none	7	9	6	6	5	17	3	3	2	3
Cb#088	4	MIE 74					none	7	7	6	6	5,5	17	3	3	3	8
Cb#110	4	TIE 69					none	7	7	6	6	5,5	17	3	3	3	3
Cb#097	4	TOIE 85					Full list of strains	7	7	6	6	5,5	17	3	3	3	7

**Slika 26.** Usporedba genotipa CbCRO05 s genotipovima u bazi podataka Coxiella2007.



Genotip	ms 03	ms 12	ms 21	ms 22	ms 30	ms 36	ms 27	ms 28	ms 31	ms 34
<b>CbCRO06</b>	7	9	6	6	5,5	16	3	3	2	3

key	Distance	strain	host	country	lon	lat	Same MLVA	m 0 3	m 1 2	m 2 1	m 2 2	m 3 3	m 3 2	m 3 7	m 3 8	m 3 1	m 3 4
Cb#132	1	Tché					none	7	9	6	6	5,5	17	3	3	2	3
Cb#046	2	CS_R	Human	Italy	12.567380	41.871940	none	7	9	6	6	5	17	3	3	2	3
Cb#044	3	CS_Florian	Human	Slovak Republic			none	7	4	6	6	5	17	3	3	2	3
Cb#110	3	TIE 69					none	7	7	6	6	5,5	17	3	3	3	3
Cb#045	3	CS_Bud	Cattle	Slovak Republic			none	7	7	6	6	5	17	3	3	2	3
Cb#087	4	PIE 46					Full list of strains	7	7	6	6	5,5	17	2	3	3	3
Cb#097	4	TOIE 85					Full list of strains	7	7	6	6	5,5	17	3	3	3	7
Cb#108	4	PIE 6					Full list of strains	7	7	6	6	5,5	8	2	3	3	3

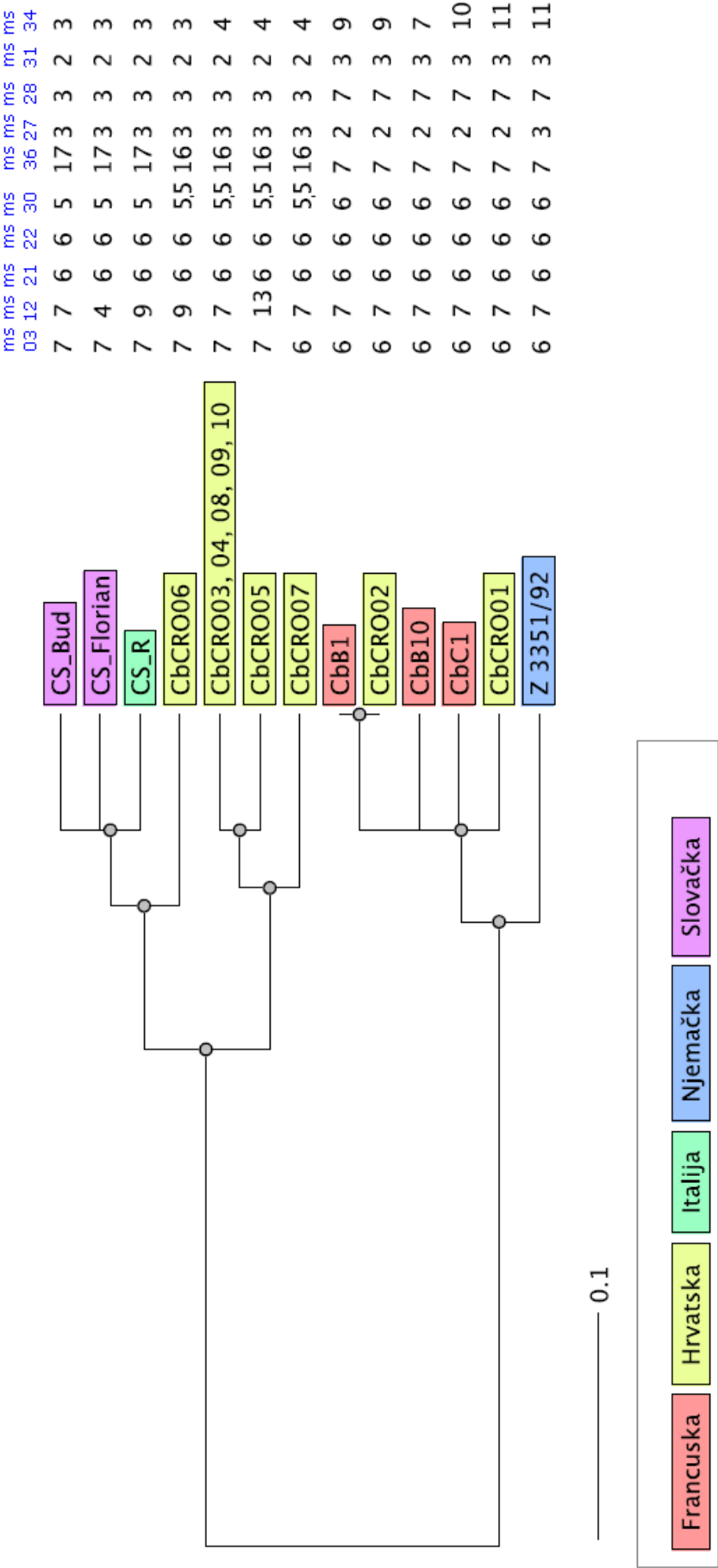
Slika 27. Usporedba genotipa CbCRO06 s genotipovima u bazi podataka Coxiella2007.

Genotip	ms 03	ms 12	ms 21	ms 22	ms 30	ms 36	ms 27	ms 28	ms 31	ms 34
<b>CbCRO07</b>	6	7	6	6	5,5	16	3	3	2	4

key	Distance	strain	host	country	lon	lat	Same MLVA	m 0 3	m 1 2	m 2 1	m 2 2	m 3 3	m 3 2	m 3 7	m 3 8	m 3 1	m 3 4
Cb#097	4	TOIE 85					Full list of strains	7	7	6	6	5,5	17	3	3	3	7
Cb#045	4	CS_Bud	Cattle	Slovak Republic			none	7	7	6	6	5	17	3	3	2	3
Cb#088	4	MIE 74					none	7	7	6	6	5,5	17	3	3	3	8
Cb#110	4	TIE 69					none	7	7	6	6	5,5	17	3	3	3	3
Cb#132	4	Tché					none	7	9	6	6	5,5	17	3	3	2	3
Cb#036	5	Z 2775/90	Cattle	Germany	10.451526	51.165691	none	6	7	6	6	6	7	3	7	3	9
Cb#039	5	Tiho 1	?	Germany	10.451526	51.165691	none	6	7	6	6	6	7	3	7	3	12
Cb#044	5	CS_Florian	Human	Slovak Republic			none	7	4	6	6	5	17	3	3	2	3

Slika 28. Usporedba genotipa CbCRO07 s genotipovima u bazi podataka Coxiella2007.



**Slika 29.** Dendrogram usporedbe genotipova bakterije *C. burnetii* u Hrvatskoj s najsirodnijim genotipovima bakterije objavljenim u bazi podataka Coxiella2007.

## 4.2.4.2. Baza podataka Coxiella2009\_Netherlands

U bazi podataka Coxiella2009\_Netherlands objavljeni su genotipovi bakterije *C. burnetii* na temelju 6 lokusa: ms23, ms24, ms27, ms28, ms33 i ms34. Kad se uzmu u obzir samo ti lokusi onda ne postoji razlika između dobivenih genotipova: CbCRO04, CbCRO05, CbCRO07, CbCRO08, CbCRO09, CbCRO10. U Tablici 27. su prikazani dobiveni genotipovi i njima najbliži genotipovi iz baze podataka Coxiella2009\_Netherlands. Princip rada s bazom podataka Coxiella2009\_Netherlands je isti kao i princip rada s bazom Coxiella2007, a to je da se upiše genotip koji se želi usporediti s genotipovima u bazi podataka nakon čega se na ekranu ispišu genotipovi najbliži upisanom genotipu. Na Slikama 30.-34. su rezultati pretraživanja baze podataka. U gornjem dijelu slike je genotip koji se uspoređuje, a na donjem dijelu slike je ispis najbližih genotipova. Žutom bojom su označeni lokusi koji se razlikuju od upisanog genotipa. Na Slici 35. prikazana je usporedba genotipova bakterije *C. burnetii* u Hrvatskoj s najbližim genotipovima bakterije objavljenim u bazi podataka Coxiella2009\_Netherlands u obliku dendograma dobivenog metodom UPGMA.

**Tablica 27.** Usporedba dobivenih genotipova bakterije *C. burnetii* s genotipovima iz baze podataka Coxiella2009\_Netherlands.

Genotip	Lokusi						Oznaka	Domaćin	Zemlja podrijetla
	ms 23	ms 24	ms 27	ms 28	ms 33	ms 34			
<b>CbCRO01</b>	5	13	2	7	9	11	—	—	Hrvatska
<b>CbCRO02</b>		13	2	7	9	9	—	—	
<b>CbCRO03</b>	3	10	3	3	4	4	—	—	
<b>CbCRO04, CbCRO05, CbCRO07, CbCRO08, CbCRO09, CbCRO10</b>	3	9	3	3	4	4	—	—	
<b>CbCRO06</b>	3	7	3	3	4	3	—	—	
—	6	13	2	7	4	9	M.IE.49	čovjek	Francuska
—	6	13	2	7	4	10	L.IE.50	čovjek	
—	3	11	3	3	2	8	M.IE.74	čovjek	
—	3	12	2	3	2	3	P.IE.40	čovjek	
—	3	9	3	4	2	2	C.IE.115	čovjek	Kanada

Genotip	ms 23	ms 24	ms 27	ms 28	ms 33	ms 34
<b>CbCRO01</b>	5	13	2	7	9	11

key	Distance	Host	Country	Source	Origin	Year	lon	lat	Same MLVA	M	M	M	M	M
										s	s	s	s	s
										2	2	2	2	3
										3	4	7	8	3
										4	7	8	3	4
M.IE.49	3	Human	France	mitral valve	Marseille, France	1994	5.3810421	43.2976116	<a href="#">Full list of strains</a>	6	13	2	7	4
L.IE.90	3	Human	France	valve	Lyon, France	1992	4.8343287	45.7672990	none	6	13	2	7	4
T.IE.42	4	Human	France	prosthetic aortic valve	Toulouse, France	1993	1.4429513	43.6043630	none	1	13	2	3	2
M.IE.1	5	Human	France	valve	Marseille, France		5.3810421	43.2976116	<a href="#">Full list of strains</a>	2	16	3	7	1
L.S.58	5	Human	France	spleen abscessus	Lyon, France	1995	4.8343287	45.7672990	<a href="#">Full list of strains</a>	1	12	2	3	2
M.IE.63	5	Human	France	mitral valve	Marseille, France	1994	5.3810421	43.2976116	<a href="#">Full list of strains</a>	2	19	3	7	1
P.IE.5	5	Human	France	plasma	Paris, France	1990	2.3509871	48.8566667	<a href="#">Full list of strains</a>	1	11	2	3	2
M.IE.3	5	Human	France	blood + valve	Marseille, France		5.3810421	43.2976116	none	2	15	3	7	1

**Slika 30.** Usporedba genotipa CbCRO01 s genotipovima u bazi podataka Coxiella2009\_Netherlands.

Genotip	ms 23	ms 24	ms 27	ms 28	ms 33	ms 34
<b>CbCRO02</b>		13	2	7	9	9

key	Distance	Host	Country	Source	Origin	Year	lon	lat	Same MLVA	M	M	M	M	M
										s	s	s	s	s
										2	2	2	2	3
										3	4	7	8	3
										4	7	8	3	4
M.IE.49	1	Human	France	mitral valve	Marseille, France	1994	5.3810421	43.2976116	<a href="#">Full list of strains</a>	6	13	2	7	4
L.IE.90	2	Human	France	valve	Lyon, France	1992	4.8343287	45.7672990	none	6	13	2	7	4
T.IE.42	3	Human	France	prosthetic aortic valve	Toulouse, France	1993	1.4429513	43.6043630	none	1	13	2	3	2
M.IE.1	4	Human	France	valve	Marseille, France		5.3810421	43.2976116	<a href="#">Full list of strains</a>	2	16	3	7	1
L.S.58	4	Human	France	spleen abscessus	Lyon, France	1995	4.8343287	45.7672990	<a href="#">Full list of strains</a>	1	12	2	3	2
M.IE.63	4	Human	France	mitral valve	Marseille, France	1994	5.3810421	43.2976116	<a href="#">Full list of strains</a>	2	19	3	7	1
P.IE.5	4	Human	France	plasma	Paris, France	1990	2.3509871	48.8566667	<a href="#">Full list of strains</a>	1	11	2	3	2

**Slika 31.** Usporedba genotipa CbCRO02 s genotipovima u bazi podataka Coxiella2009\_Netherlands.

Genotip	ms 23	ms 24	ms 27	ms 28	ms 33	ms 34
<b>CbCRO03</b>	3	10	3	3	4	4

key	Distance	Host	Country	Source	Origin	Year	lon	lat	Same MLVA	M 2 3	M 2 4	M 2 7	M 2 8	M 3 3	M 3 4
M.IE.74	3	Human	France	prosthetic aortic valve	Toulouse, France	1998	1.4429513	43.6043630	<a href="#">Full list of strains</a>	3	11	3	3	2	8
TO.IE.85	3	Human	France	blood	Tours, France	1999	0.6888514	47.3902942	<a href="#">Full list of strains</a>	3	11	3	3	2	7
PIE.40	4	Human	France	aortic valve ring / prosthetic valve ring	Paris, France	1993	2.3509871	48.8566667	<a href="#">Full list of strains</a>	3	12	2	3	2	3
M.AC.57	4	Human	France	blood	Martigues, France	1996	5.0548299	43.4074625	<a href="#">Full list of strains</a>	3	14	3	7	2	2
C.IE.115	4	Human	Canada	valve	Alberta, Canada	2003	-116.5765035	53.9332706	<a href="#">Full list of strains</a>	3	9	3	4	2	2
QKP2	4	Human	Netherlands	urine	Balgeij, Netherlands	2008	5.7146980	51.7805639	<a href="#">Full list of strains</a>	6	11	3	3	2	7
M.HP.51	4		Spain	placenta	Madrid, Spain	1995	-3.7003454	40.4166909	none	3	15	3	7	2	2

**Slika 32.** Usporedba genotipa CbCRO03 s genotipovima u bazi podataka Coxiella2009\_ Netherlands.

Genotip	ms 23	ms 24	ms 27	ms 28	ms 33	ms 34
<b>CbCRO04, CbCRO05, CbCRO07, CbCRO08, CbCRO09, CbCRO10</b>	3	9	3	3	4	4

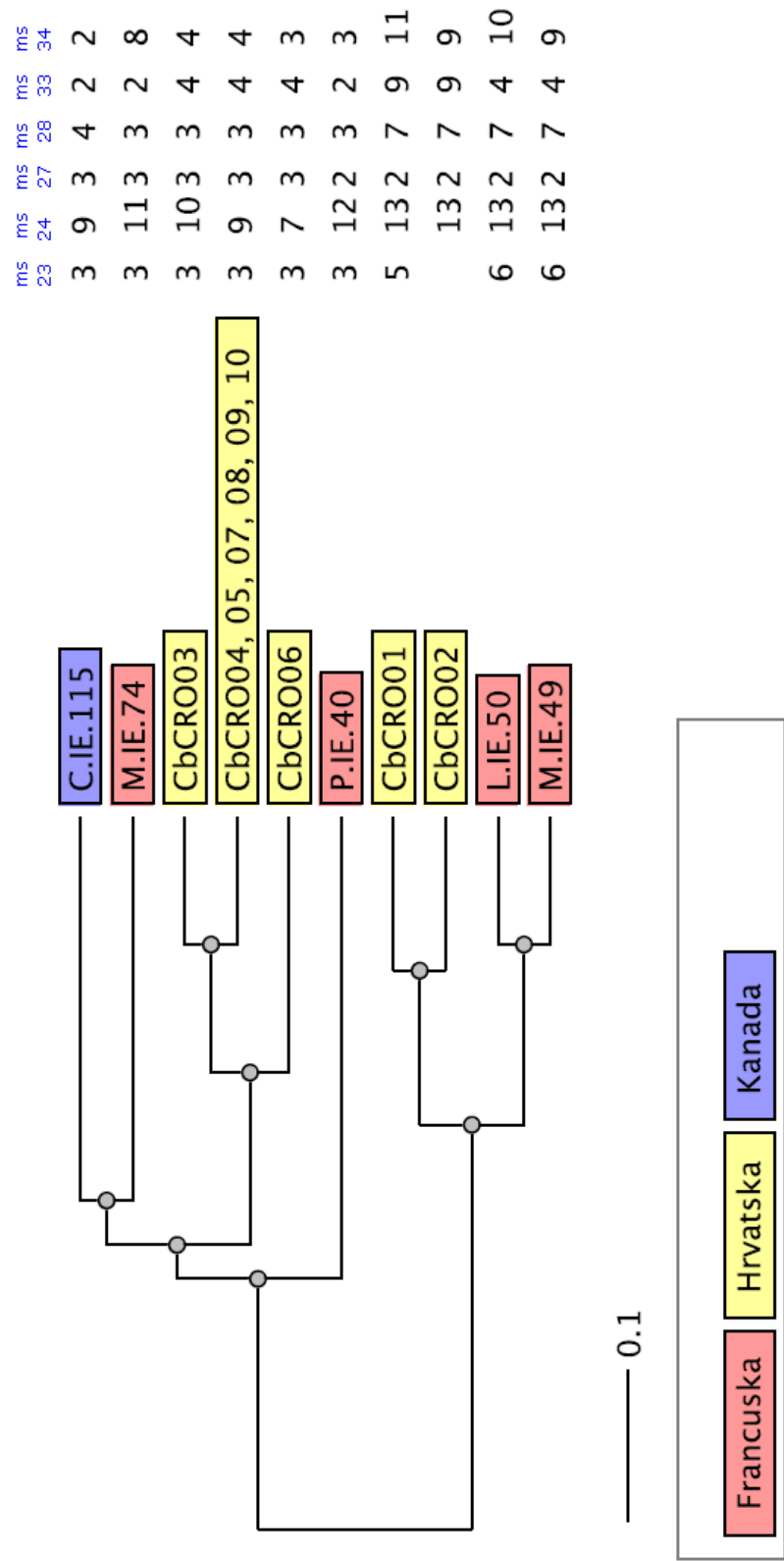
key	Distance	Host	Country	Source	Origin	Year	lon	lat	Same MLVA	M 2 3	M 2 4	M 2 7	M 2 8	M 3 3	M 3 4
C.IE.115	3	Human	Canada	valve	Alberta, Canada	2003	-116.5765035	53.9332706	<a href="#">Full list of strains</a>	3	9	3	4	2	2
M.IE.74	3	Human	France	prosthetic aortic valve	Toulouse, France	1998	1.4429513	43.6043630	<a href="#">Full list of strains</a>	3	11	3	3	2	8
TO.IE.85	3	Human	France	blood	Tours, France	1999	0.6888514	47.3902942	<a href="#">Full list of strains</a>	3	11	3	3	2	7
M.AC.57	4	Human	France	blood	Martigues, France	1996	5.0548299	43.4074625	<a href="#">Full list of strains</a>	3	14	3	7	2	2
PIE.40	4	Human	France	aortic valve ring / prosthetic valve ring	Paris, France	1993	2.3509871	48.8566667	<a href="#">Full list of strains</a>	3	12	2	3	2	3
M.IE.71	4	Human	France	prosthetic aortic valve	Saint Laurent du Var, France	1997	7.1902731	43.6733839	<a href="#">Full list of strains</a>	3	9	4	5	2	2
QKP2	4	Human	Netherlands	urine	Balgeij, Netherlands	2008	5.7146980	51.7805639	<a href="#">Full list of strains</a>	6	11	3	3	2	7

**Slika 33.** Usporedba genotipova CbCRO04, CbCRO05, CbCRO07, CbCRO08, CbCRO09, CbCRO10 s genotipovima u bazi podataka Coxiella2009\_ Netherlands.

Genotip	ms 23	ms 24	ms 27	ms 28	ms 33	ms 34
<b>CbCRO06</b>	3	7	3	3	4	3

key	Distance	Host	Country	Source	Origin	Year	lon	lat	Same MLVA	M s 2 3	M s 2 4	M s 2 7	M s 2 8	M s 3 3	M s 3 4
PIE.40	3	Human	France	aortic valve ring / prosthetic valve ring	Paris, France	1993	2.3509871	48.8566667	<a href="#">Full list of strains</a>	3	12	2	3	2	3
M.IE.74	3	Human	France	prosthetic aortic valve	Toulouse, France	1998	1.4429513	43.6043630	<a href="#">Full list of strains</a>	3	11	3	3	2	8
TO.IE.85	3	Human	France	blood	Tours, France	1999	0.6888514	47.3902942	<a href="#">Full list of strains</a>	3	11	3	3	2	7
Tché	3	Human		Henzerling (resistant to antibiotics)	ND,		-101.0020119	47.5514926	none	4	8	3	3	3	3
M.AC.57	4	Human	France	blood	Martigues, France	1996	5.0548299	43.4074625	<a href="#">Full list of strains</a>	3	14	3	7	2	2
C.IE.115	4	Human	Canada	valve	Alberta, Canada	2003	-116.5765035	53.9332706	<a href="#">Full list of strains</a>	3	9	3	4	2	2

**Slika 34.** Usporedba genotipa CbCRO06 s genotipovima u bazi podataka Coxiella2009\_ Netherlands.



**Slika 35.** Dendrogram usporedbe genotipova bakterije *C. burnetii* u Hrvatskoj s najsjrodnijim genotipovima bakterije objavljenim u bazi podataka Coxiella2009\_Netherlands.

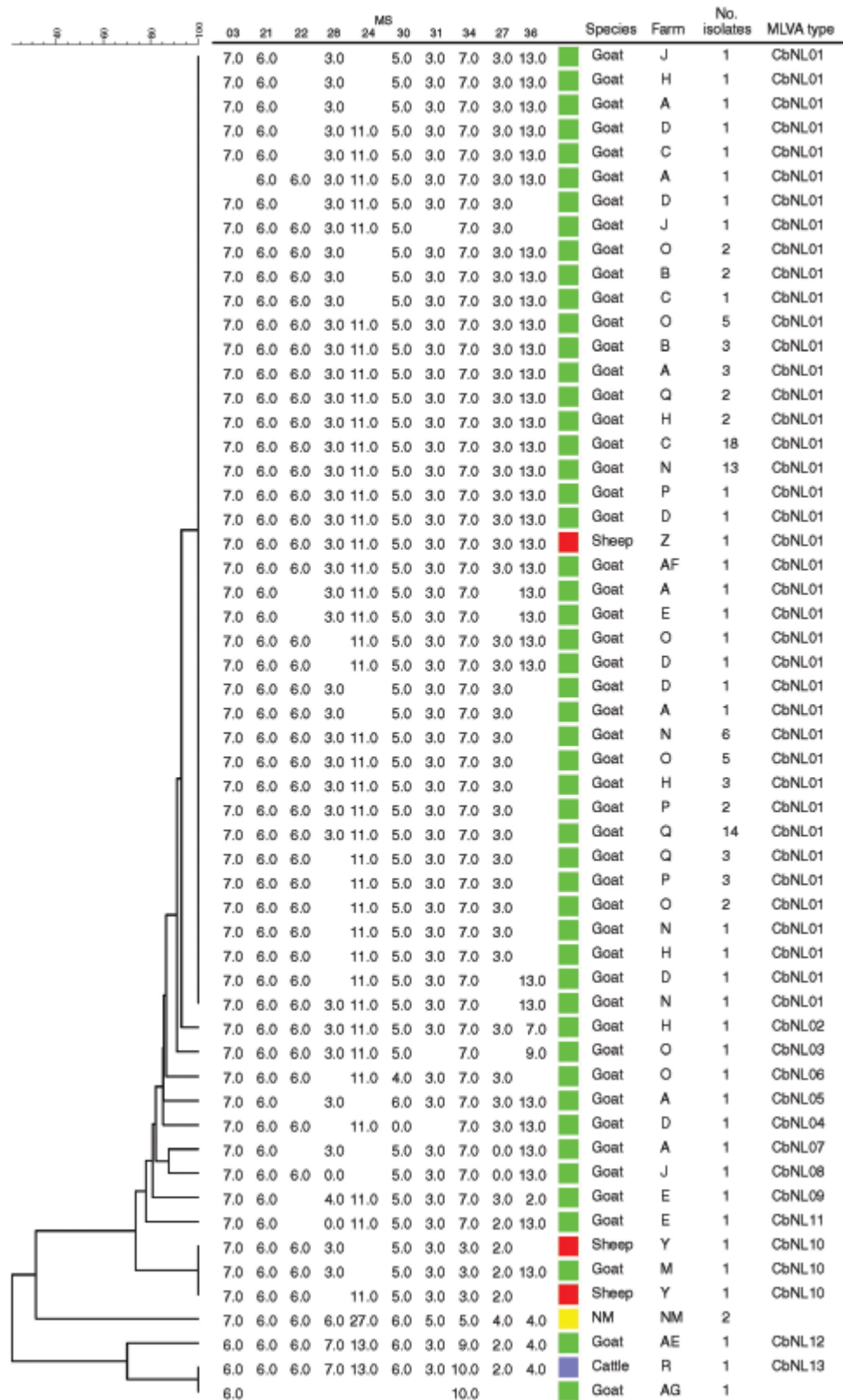
#### 4.2.4.3. Genotipovi bakterije *C. burnetii* u Nizozemskoj

Nizozemski znanstvenici Roest i suradnici (2011.) su za genotipizaciju sojeva bakterije *C. burnetii* koristili 10 lokusa: ms03, ms21, ms22, ms28, ms24, ms30, ms31, ms34, ms27 i ms36. Ako se uzmu u obzir samo ti lokusi onda se dobiveni genotipovi CbCRO04, CbCRO05, CbCRO08, CbCRO09, CbCRO10 međusobno ne razlikuju. U Tablici 28. su prikazani dobiveni genotipovi i neki od nizozemskih genotipova. Roest i suradnici su objavili ukupno 20 no u Tablici 28. su navedena samo 4 genotipa (CbNL01, CbNL02, CbNL012 i CbNL013) i to oni koji su najbližiji dobivenim genotipovima. Genotip CbNL012 se razlikuje se od CbCRO02 samo u lokusu ms36, dok se genotip CbNL013 razlikuje se od CbCRO01 i CbCRO02 u lokusima ms34 i ms36. Ostali nizozemski genotipovi se od dobivenih razlikuju na 4 i više lokusa, a uz to nemaju navedene brojeve ponavljanja za neke lokuse. Svi genotipovi objavljeni u radu Roesta i suradnika (2011.) prikazani su na Slici 36. Na Slici 37. prikazana je usporedba genotipova bakterije *C. burnetii* u Hrvatskoj s najbližim genotipovima bakterije objavljenim u radu Roesta i suradnika (2011.) u obliku dendograma dobivenog metodom UPGMA.

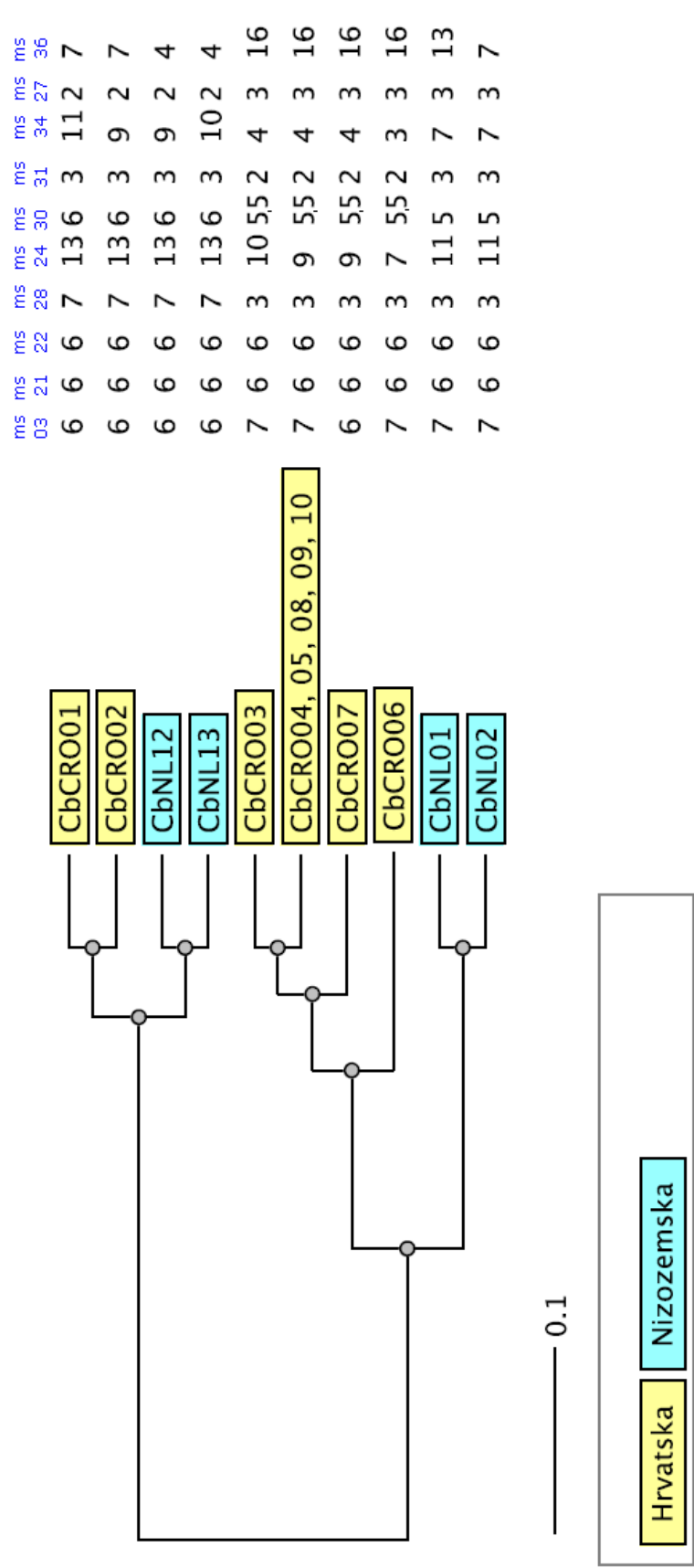


**Tablica 28.** Usporedba genotipova bakterije *C. burnetii* u Hrvatskoj s genotipovima u Nizozemskoj. Nizozemski genotipovi preuzeti iz rada Roest i sur., 2011. Genotipovi CbCRO02 i CbNL012 (označeni plavom bojom) razlikuju se samo u lokusu ms36 (označen žutom bojom).

Zemlja podrijetla	Genotip	Lokusi									
		ms 03	ms 21	ms 22	ms 28	ms 24	ms 30	ms 31	ms 34	ms 27	ms 36
Hrvatska	CbCRO01	6	6	6	7	13	6	3	11	2	7
	CbCRO02	6	6	6	7	13	6	3	9	2	7
	CbCRO03	7	6	6	3	10	5,5	2	4	3	16
	CbCRO04, CbCRO05, CbCRO08, CbCRO09, CbCRO10	7	6	6	3	9	5,5	2	4	3	16
	CbCRO06	7	6	6	3	7	5,5	2	3	3	16
	CbCRO07	6	6	6	3	9	5,5	2	4	3	16
Nizozemska	CbNL01	7	6	6	3	11	5	3	7	3	13
	CbNL02	7	6	6	3	11	5	3	7	3	7
	CbNL12	6	6	6	7	13	6	3	9	2	4
	CbNL13	6	6	6	7	13	6	3	10	2	4



**Slika 36.** Filogenetsko stablo s genotipovima bakterije *C. burnetii* iz Nizozemske. (Preuzeto iz Roest i sur., 2011.)



**Slika 37.** Dendrogram usporedbe genotipova bakterije *C. burnetii* u Hrvatskoj s najsjrodnijim genotipovima bakterije objavljenim u radu Roesta i suradnika (2011.).

4.2.4.4. Genotipovi bakterije *C. burnetii* u Poljskoj

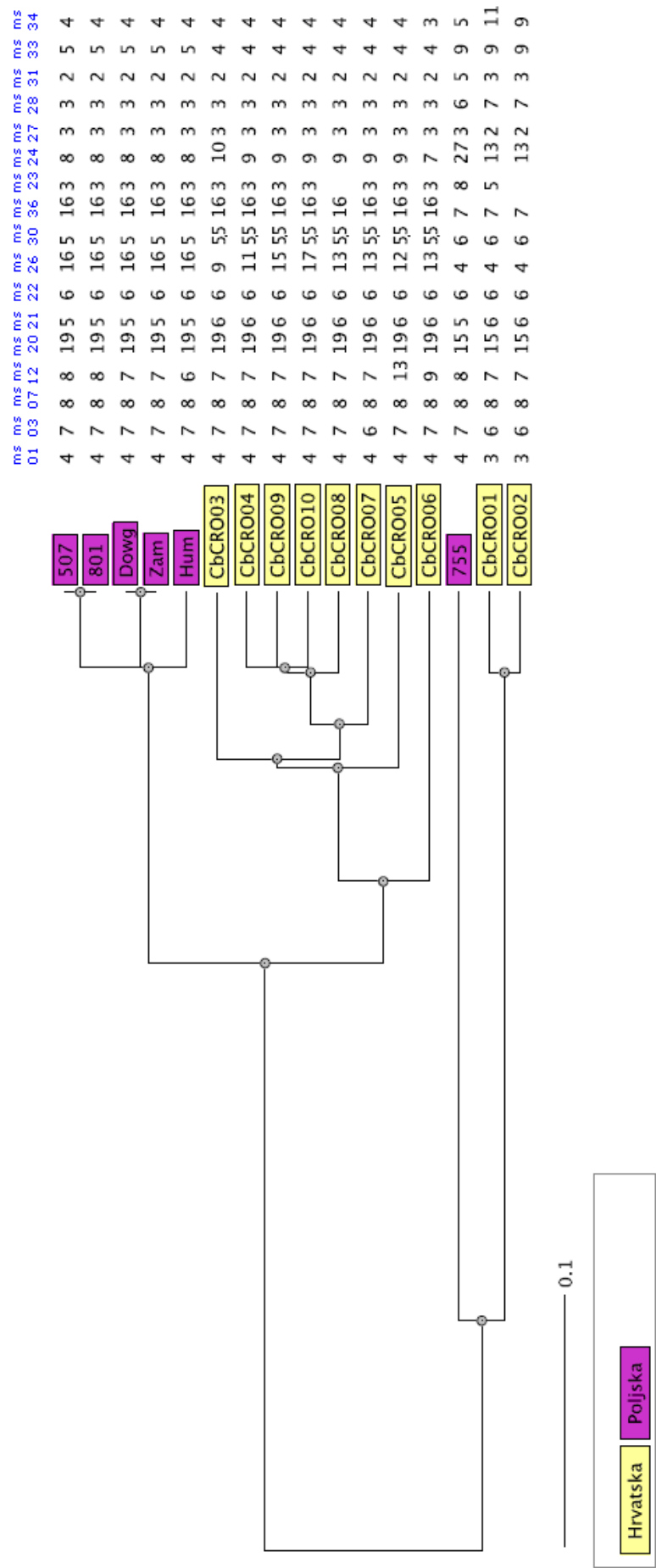
Poljski znanstvenici Chmielewski i suradnici (2009.) su u genotipizaciji sojeva bakterije *C. burnetii* koristili svih 17 lokusa. U Tablici 29. su prikazani dobiveni genotipovi, a plavom bojom su označeni brojevi ponavljanja koji se podudaraju s brojevima ponavljanja u poljskih izolata. Svi genotipovi objavljeni u radu Chmielewskog i suradnika (2009.) prikazani su na Slici 38., a usporedba MLVA genotipova bakterije *C. burnetii* u Hrvatskoj s najrodnijim genotipovima *C. burnetii* objavljenim u radu Chmielewskog i suradnika (2009.) prikazana je na Slici 39. Usporedba je prikazana u obliku dendograma dobivenog metodom UPGMA.

**Tablica 29.** Tablica s dobivenim genotipovima bakterije *C. burnetii*. Plavom bojom su označeni brojevi ponavljanja koji se podudaraju s brojevima ponavljanja u poljskih izolata.

MLVA genotip	ms 01	ms 03	ms 07	ms 12	ms 20	ms 21	ms 22	ms 26	ms 30	ms 36	ms 23	ms 24	ms 27	ms 28	ms 31	ms 33	ms 34
CbCRO01	3	6	8	7	15	6	6	4	6	7	5	13	2	7	3	9	11
CbCRO02	3	6	8	7	15	6	6	4	6	7		13	2	7	3	9	9
CbCRO03	4	7	8	7	19	6	6	9	5.5	16	3	10	3	3	2	4	4
CbCRO04	4	7	8	7	19	6	6	11	5.5	16	3	9	3	3	2	4	4
CbCRO05	4	7	8	13	19	6	6	12	5.5	16	3	9	3	3	2	4	4
CbCRO06	4	7	8	9	19	6	6	13	5.5	16	3	7	3	3	2	4	3
CbCRO07	4	6	8	7	19	6	6	13	5.5	16	3	9	3	3	2	4	4
CbCRO08	4	7	8	7	19	6	6	13	5.5	16		9	3	3	2	4	4
CbCRO09	4	7	8	7	19	6	6	15	5.5	16	3	9	3	3	2	4	4
CbCRO10	4	7	8	7	19	6	6	17	5.5	16	3	9	3	3	2	4	4

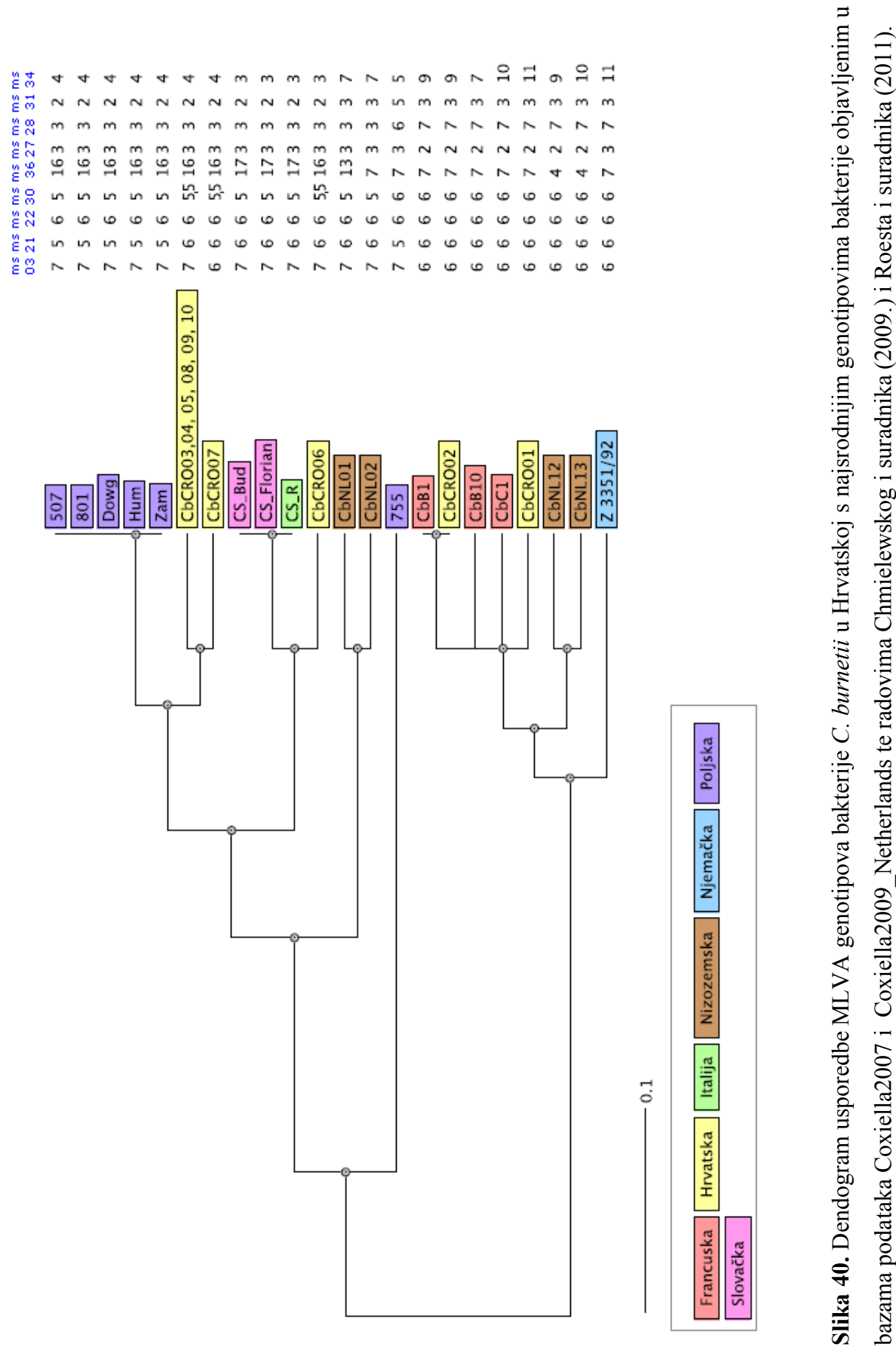
Strain	Origin (Year)	Country (Town)	MLVA patterns																	MLVA type
			Panel I										Panel II							
			ms01	ms03	ms07	ms12	ms20	ms21	ms22	ms26	ms30	ms36	ms23	ms24	ms27	ms28	ms31	ms33	ms34	
Nine Mile (ref. strain)	Tick (1935)	USA (Montana)	4.0	7.0	8.0	<b>8.0</b>	15.0	5.0	6.0	4.0	6.0	7.0	8.0	27.0	<b>4.0</b>	6.0	5.0	9.0	5.0	A
755	Human blood (1956)	Poland (Gorlice)	4.0	7.0	8.0	<b>8.0</b>	15.0	5.0	6.0	4.0	6.0	7.0	8.0	27.0	<b>3.0</b>	6.0	5.0	9.0	5.0	B
801	Cattle placenta (1993)	Poland (Leszno)	4.0	7.0	8.0	<b>8.0</b>	19.0	5.0	6.0	16.0	5.0	16.0	3.0	8.0	<b>3.0</b>	3.0	2.0	5.0	4.0	C
507	Cattle placenta (1993)	Poland (Leszno)	4.0	7.0	8.0	<b>8.0</b>	19.0	5.0	6.0	16.0	5.0	16.0	3.0	8.0	<b>3.0</b>	3.0	2.0	5.0	4.0	C
Zam	Cattle placenta (1983)	Poland (Zamość)	4.0	7.0	8.0	<b>7.0</b>	19.0	5.0	6.0	16.0	5.0	16.0	3.0	8.0	<b>3.0</b>	3.0	2.0	5.0	4.0	D
Dowg	Bull semen (1989)	Poland (Koszalin)	4.0	7.0	8.0	<b>7.0</b>	19.0	5.0	6.0	16.0	5.0	16.0	3.0	8.0	<b>3.0</b>	3.0	2.0	5.0	4.0	D
Hum	Human urine (1991)	Poland (Warsaw)	4.0	7.0	8.0	<b>6.0</b>	19.0	5.0	6.0	16.0	5.0	16.0	3.0	8.0	<b>3.0</b>	3.0	2.0	5.0	4.0	E
Henzerling (ref. strain)	Human blood (1945)	Italy	4.0	7.0	8.0	<b>6.0</b>	19.0	5.0	6.0	16.0	5.0	16.0	3.0	8.0	<b>3.0</b>	3.0	2.0	5.0	4.0	E

**Slika 38.** Genotipovi bakterije *C. burnetii* u Poljskoj. (Preuzeto iz Chmielewski i sur., 2009.)



**Slika 39.** Dendrogram usporedbe MLVA genotipova bakterije *C. burnetii* u Hrvatskoj s najsirodnijim genotipovima bakterije objavljenim u radu Chmielewskog i suradnika (2009.).

Na Slici 40. prikazana je usporedba MLVA genotipova bakterije *C. burnetii* u Hrvatskoj s najsrodnijim genotipovima bakterije objavljenim u bazama podataka Coxiella2007 i Coxiella2009\_Netherlands te radovima Chmielewskog i suradnika (2009.) i Roesta i suradnika (2011). Usporedba je rađena samo na temelju lokusa koji se javljaju u svim navedenim bazama i radovima, a prikazana je pomoću dendograma dobivenog metodom UPGMA.



**Slika 40.** Dendogram usporedbe MLVA genotipova bakterije *C. burnetii* u Hrvatskoj s najrodnijim genotipovima bakterije objavljenim u bazama podataka Coxiella2007 i Coxiella2009\_Netherlands te radovima Chmielewskog i suradnika (2009.) i Roesta i suradnika (2011).

### 4.3. Indeks HGDI

Za svaki lokus je određeno koliko se puta javlja pojedini alel i na temelju tih podataka je izračunat indeks HGDI (Tablica 30.). Na primjer: za lokus ms01 alel s 3 ponavljanja se javlja tri puta, a alel s 4 ponavljanja se javlja 13 puta. Ukupan broj uzoraka je 16. Podatci su uvršteni u formulu za računanje HGDI:

$$D=1-\frac{1}{N(N-1)}\sum_{j=1}^s n_j(n_j-1)$$

Gdje je:

$$N = 14$$

$$s = 2$$

$$n_1 = 3$$

$$n_2 = 11$$

$$D=1-1/(14*13)*((3*2)+(11*10))=0,363$$

Indeks HGDI za lokus ms01 je 0,363.

Za 14 genotipiziranih uzoraka, lokusi ms07, ms21 i ms22 imali su samo po jedan alel odnosno ne pokazuju nikakvu diskriminatornu moć (HGDI = 0). Najčešće su lokusi imali po dva alela i to tako da su tri uzorka imala jedan alel, a ostalih 11 drugi alel (HGDI = 0,363). Nešto veću diskriminatornu moć pokazao je lokus ms24 s četiri alela (HGDI = 0,648), dok najveću diskriminatornu moć odnosno najveću raznolikost pokazuje lokus ms26 sa čak sedam alela (HGDI = 0,901).

Indeks HGDI za dobivene MLVA genotipove je 0,956 – od ukupno 14 uzoraka dobiveno je 10 različitih genotipova. Genotipovi CbCRO01, CbCRO04, CbCRO05, CbCRO06, CbCRO07 i CbCRO08 javljaju se jedan put, a genotipovi CbCRO02, CbCRO03, CbCRO09 i CbCRO10 javljaju se dva puta.

Kad bi se za genotipizaciju koristili samo lokusi panela 1, 14 uzoraka bi bilo svrstano u devet genotipova (Tablica 23.) dok su inače, kad se koriste lokusi panela 1 i 2, uzorci svrstani u 10 genotipova. Razlika je samo u tome što se pri korištenju lokusa panela 1 i 2 mogu razlikovati genotipovi CbCRO01 i CbCRO02, a kad se koriste lokusi samo panela 1 ti genotipovi se ne mogu razlikovati. U genotip 1 bi bila svrstana tri uzorka, u genotipove 2, 8 i



9 po dva uzorka, a u ostale genotipove (genotip 3, 4, 5, 6 i 7) po jedan uzorak. Kad bi se za genotipizaciju koristili samo lokusi panela 1 HGDI bi bio 0,934.

U slučaju kad bi se za genotipizaciju koristili lokusi panela 1 bez lokusa ms26 koji ima vrlo velik indeks HGDI (0,901), indeks HGDI bi bio 0,659. Genotipizacijom 14 uzoraka pomoću lokusa panela 1 bez lokusa ms26, dobilo bi se pet genotipova (Tablica 24.). Genotip 1 bi imali uzorci s genotipovima CbCRO01 i CbCRO02 (tri uzorka), dok bi genotip 2 imalo osam uzoraka, uzorci s genotipovima CbCRO03, CbCRO04, CbCRO08, CbCRO09 i CbCRO10. Genotipove 3, 4 i 5 imali bi po jedan uzorak.

Genotipizacijom pomoću lokusa panela 2 dobilo bi se pet genotipova (Tablica 25.), a HGDI bi bio 0,670. Genotip 1 i 5 bi imali po jedan uzorak, genotip 2 i 3 po dva uzorka, a genotip 4 osam uzoraka.

**Tablica 30.** Broj javljanja pojedinog alela za određeni lokus i indeks HGDI za svaki lokus, za svaki panel i za metodu MLVA.

Broj javljanja određenog alela																	
Lokus Alela X ponavljanja	ms01	ms03	ms07	ms12	ms20	ms21	ms22	ms26	ms30	ms36	ms23	ms24	ms27	ms28	ms31	ms33	ms34
X																	
1																	
2																	
3	3										8		3		11		
4	11							3					11	11	3		1
5											1						10
5,5									11								
6		4				14	14		3								
7		10		12						3		1		3			
8			14														
9				1				2				8				3	2
10												2					
11								1									1
12								1									
13				1				3				3					
14																	
15					3			2									
16										11							
17								2									
18																	
19					11												
	0,363	0,44	0	0,275	0,363	0	0	0,901	0,363	0,363	0,222 <sup>a</sup>	0,648	0,363	0,363	0,363	0,363	0,495
HGDI	PANEL 1 0,934 (PANEL 1 bez lokusa ms26 0,659)										PANEL 2 0,670						
MLVA 0,956																	

\*pri računanju indeksa HGDI za lokus ms23 u obzir su uzeti samo uzorci kod kojih se javio PCR produkt.

## **5. *RASPRAVA***

Bakterija *Coxiella burnetii* je vrlo infektivna bakterijska vrsta i proširena je po cijelom svijetu (Arricau-Bouvery i Rodolakis, 2005.). Najčešći način infekcije bakterijom *C. burnetii* u ljudi i životinja je inhalacija aerosola kontaminiranog ovom bakterijom (Tissot-Dupont i sur., 2004.). Bakterija u okoliš dopijeva iz mlijeka, fecesa, urina i sline inficiranih životinja. Najviše bakterija u okoliš dopijeva prilikom poroda i/ili pobačaja u domaćih životinja (vaginalni sekret, posteljica i amnionska tekućina) (Vaidya i sur., 2010.). Posteljicom se izluči čak do  $10^9$  bakterija po gramu tkiva (Arricau-Bouvery i Rodolakis, 2005.).

Metoda TRANS  $\frac{1}{2}$  PCR korištena je za dokazivanje prisustva DNA bakterije *C. burnetii* u dostavljenim uzorcima. DNA bakterije je dokazana u mlijeku, organima pobačenih plodova, obriscima rodnice i posteljicama krava, koza i ovaca koje su pobacile. Takvi nalazi su u skladu s očekivanjima jer upravo u tim uzorcima se očekuje prisustvo bakterije (Vaidya i sur., 2010.; Arricau-Bouvery i Rodolakis, 2005.). U fecesu nije dokazana DNA bakterije no razlog tome je vjerojatno premali broj obrađenih uzoraka (samo tri uzorka).

Najveći postotak uzoraka u kojima je dokazana DNA bakterije *C. burnetii* u odnosu na broj testiranih uzoraka bio je onaj podrijetlom od koza (48,1%). Iz toga bi se moglo zaključiti da je u koza u Hrvatskoj infekcija bakterijom *C. burnetii* jedan od vodećih uzroka pobačaja.

Metodom TRANS  $\frac{1}{2}$  PCR je pretražen 1881 uzorak krvi koji je metodom RVK bio pozitivan na Q-groznicu. U samo 145 (7,7%) uzoraka je utvrđeno prisustvo DNA bakterije *C. burnetii*. Tako malen broj pozitivnih nalaza je i očekivan. Schneeberger i suradnici (2010.) su usporedili molekularne i serološke metode za dijagnostiku Q-groznice. Ustanovili su da su molekularne metode učinkovite u detekciji DNA bakterije *C. burnetii* u ranom stadiju infekcije dok su se u stadiju kad se u krvi jave protutijela serološke metode pokazale pouzdanije. Kad se u krvi jave protutijela, imunološkim odgovorom organizma broj bakterija u krvi se spusti ispod razine detekcije. U uzorcima krvi koji su pretraživani u ovom radu protutijela za bakteriju *C. burnetii* već su se bila javila što znači da se količina bakterija smanjila i time se smanjila vjerojatnost detekcije DNA bakterije *C. burnetii* u krvi. No izolacija DNA iz krvi je ipak rađena kako bi se povećao ukupni broj uzoraka DNA bakterije *C. burnetii*.

Najveći broj uzoraka pozitivnih metodom TRANS  $\frac{1}{2}$  PCR dolazi iz Splitsko-dalmatinske županije (71 uzorak). Takvo stanje u Hrvatskoj objašnjavaju Mulić i suradnici (2010.) koji su u svom istraživanju također utvrdili da je županija s najvećim brojem oboljelih od Q-groznice Splitsko-dalmatinska. Kao mogući razlog navode ilegalnu ispašu jer se u poslijeratnom razdoblju zimska ilegalna ispaša ovaca iz Bosne i Hercegovine odvija na području ove županije.

Do sada je objavljeno samo pet radova u kojima je bakterija *C. burnetii* genotipizirana metodom MLVA. Istodobno je malen i ukupan broj uzoraka koji se opisuju u nekim radovima pa su tako Chmielewski i suradnici (2009.) su obradili samo šest uzoraka (Tablica 8.). Također, samo su Arricau-Bouvery i suradnici (2006.) i Chmielewski i suradnici (2009.) u genotipizaciji koristili svih 17 lokusa dok su drugi istraživači koristili 10 (Roest i sur., 2011.), 7 (Svraka i sur., 2006.) ili samo 3 MLVA lokusa (Klaassen i sur., 2009.).

Rezultati naših MLVA analiza lokusa ms30, ms36 i ms31 nisu bili usporedivi s rezultatima tipizacije bakterije *C. burnetii* u istraživanju Arricau-Bouvery i suradnika (2006.), ali bili su usporedivi s rezultatima tipizacije Roesta i suradnika (2011.). Alatom Primer-BLAST su pretražene baze podataka i dobiveni su isti rezultati kao u ovom istraživanju i kao u istraživanju Roesta i suradnika (2011.). Stoga su dobiveni rezultati uzeti u obzir pri određivanju genotipova. Nepoklapanja u rezultatima se mogu objasniti time da je metoda MLVA kao metoda za genotipizaciju bakterije *C. burnetii* još nova metoda i nije standardizirana. Radove u kojima se metoda MLVA koristi za genotipizaciju bakterije *C. burnetii* objavili su za sada tek Svraka i suradnici (2006.), Arricau-Bouvery i suradnici (2006.), Chmielewski i suradnici (2009.), Klaassen i suradnici (2009.) i Roest i suradnici (2011.) (Tablica 8.). U svom radu Svraka i suradnici (2006.) primijetili su razliku između rezultata dobivenih kapilarnom elektroforezom i rezultata dobivenih sekvenciranjem. Smatraju da do nepodudaranja podataka dolazi zbog sekundarne strukture produkata PCR-a. Pri određivanju broja ponavljanja u obzir su uzeli podatke dobivene kapilarnom elektroforezom.

Iz rezultata pretraživanja alatom Primer-BLAST s početnicama za lokus ms30 (Slika 15.) vidljivo je da te početnice u genomu ref. soja Nine Mile faze I RSA493 umnažaju odsječak DNA veličine 306 pb (6 ponavljanja), a u genomu soja vrste *C. burnetii* RSA 331 umnažaju odsječak DNA veličine 297 pb. Odsječak DNA veličine 297 pb ne bi smjelo biti moguće dobiti s obzirom da je veličina ponavljajućeg slijeda 18 pb. U bazi podataka Coxiella2007 za neke uzorke za lokus ms30 5,5 naveden je kao broj ponavljanja. Budući da su u ovom radu dobiveni odsječci DNA veličine oko 297 pb taj broj (5,5) je naveden kao broj ponavljanja. Utvrđene razlike u veličini produkata umnažanja mogu se objasniti na dva načina. Jedno moguće objašnjenje je to da je veličina ponavljajućeg slijeda 9 pb, a ne 18 pb, a drugo je da je došlo do delecije ponavljajućeg slijeda i on sad više nije veličine 18 pb nego 9 pb.

Za genotipizaciju metodom MLVA izabrano je 49 uzoraka (izoliranih DNA) no reakcije MLVA PCR na svih 17 ili 16 lokusa uspjele su samo kod 15 uzoraka. Kod ostalih uzoraka nije bilo PCR produkata za 6 ili više lokusa. Sličnu situaciju opisali su Roest i suradnici (2011.). Oni su od 238 obrađenih uzoraka MLVA genotip dobili tek za 125 uzoraka (53%). Kod 52 uzorka je dobiven cijeli genotip, kod 48 uzoraka nedostaje jedna vrijednost, a kod 25 uzoraka nedostaju dvije vrijednosti. Za ostalih 113 uzoraka dobili su djelomične genotipove u kojima nedostaje 3–10 vrijednosti. Svraga i suradnici (2006.), Arricau-Bouvery i suradnici (2006.) i Chmielewski i suradnici (2009.) MLVA genotipizaciju radili su tako da su iz uzoraka prvo izdvojili samu bakteriju a zatim iz bakterijskih kolonija izolirali DNA koju su koristili za genotipizaciju. Tako su dobili velike količine DNA te im je genotipizacija uspjela za sve uzorke. Klaassen i suradnici (2009.) i Roest i suradnici (2011.) su za genotipizaciju koristili DNA izoliranu direktno iz kliničkih uzoraka, bez uzgoja bakterije. Najveća mana u tipizaciji takvih uzoraka je promjenjiva kvaliteta i količina DNA zbog koje se pri genotipizaciji javljaju nepotpuni genotipovi.

Klaassen i suradnici (2009.) su zbog toga za genotipizaciju izabrali tri lokusa s najkraćim ponavljajućim sljedovima jer su smatrali da je tako veća vjerojatnost da će doći do uspješnog umnažanja u PCR reakcijama. Unatoč tome za jedan uzorak na jednom lokusu nisu dobili PCR produkt.

Roest i suradnici (2011.) razmatrali su da li vrijednosti za neke lokuse izostaju zbog male koncentracije i loše kvalitete DNA ili ti lokusi jednostavno nisu prisutni u nekim sojevima bakterija. Ako neki lokusi nisu prisutni, očekivano je da se neće pojaviti ni u uzorcima s velikim koncentracijama DNA. No to nije bio slučaj. Uzorci s većim koncentracijama DNA dali su potpune, a s manjim koncentracijama nepotpune genotipove.

Tako je i u ovom radu tek za malen postotak uzoraka (30,6%) dobiven MLVA genotip premda su za genotipizaciju izabrani uzorci s najvećim koncentracijama DNA. To ukazuje na potrebu razvijanja metoda koje će omogućiti izolaciju kvalitetnije DNA u većim koncentracijama. Uspješnosti izolacije DNA doprinijelo bi i dostavljanje većeg broja uzoraka različitih životinja iz stada u kojemu je utvrđena infekcija bakterijom *C. burnetii*.

Od ukupno 15 uzoraka za koje je genotipizacija uspjela, PCR reakcija za lokus ms23 nije dala nikakav produkt za 5 uzoraka. U slučajevima kad su se dva uzorka poklapala u svim lokusima, a lokus ms23 je kod jednog imao PCR produkt a kod drugog nije, uzorci su svrstani u isti genotip.

Genotip uzorka 16 je označen kao genotip CbCRO01. To je najstariji genotipizirani uzorak (DNA izolirana 16.3.2006. godine). Njegova posebnost je u tome da na lokusu ms23

ima 5 ponavljanja dok drugi genotipovi imaju 3 ponavljanja ili uopće nije došlo do umnažanja DNA. Izuzetak je uzorak 32 koji za taj lokus u elektroforezi ima dva benda koji predstavljaju odsječke od 2 i 3 ponavljanja.

Genotip CbCRO01 je najsrodniji genotipu CbCRO02. Međusobno se CbCRO01 i CbCRO02 razlikuju samo po lokusu ms34 i lokusu ms23. Kod uzoraka genotipa CbCRO02 na lokusu ms23 nije došlo do umnažanja DNA. Genotip CbCRO02 imaju dva uzorka, uzorci 41 i 43. Jedan je izoliran 2011., a jedan 2012. godine. Kako su zaprimljeni i obrađeni u različito vrijeme, isključena je mogućnost da su genotipovi tih uzoraka isti zbog međusobne kontaminacije. Uzorci su pristigli iz Koprivničko-križevačke i Osječko-baranjske, dok je uzorak 16 također pristigao iz Osječko-baranjske županije čime se može objasniti srodstvo genotipova CbCRO01 i CbCRO02. Genotipovi CbCRO01 i CbCRO02 se od svih ostalih genotipova razlikuju u čak 10 lokusa i možemo ih smatrati dominantnim za kontinentalnu regiju Hrvatske.

Genotipovi CbCRO04, CbCRO08, CbCRO09 i CbCRO10 međusobno se razlikuju samo u lokusu ms26. Za genotip CbCRO08 nije došlo do umnažanja na lokusu ms23, a za ostale genotipove umnažanje na lokusu ms23 je kod nekih uzoraka uspjelo, a kod nekih nije. Zanimljivo je da se genotip CbCRO10 prvi put javio 2008. godine (uzorak 24) i zatim ponovo 2011. godine (uzorak 40). Uzorak 24 je iz Ličko-senjske, a uzorak 40 iz Šibensko-kninske županije tako da se ta dva uzorka ne mogu ni teritorijalno povezati iako se ne može isključiti širenje uzročnika migracijom domaćih i divljih životinja. Također, od uzoraka s genotipom CbCRO10 jedan je podrijetlom iz kože, a jedan iz ovce pa se za soj bakterije *C. burnetii* koja je inficirala spomenute životinje ne može reći da je specifičan za određenu vrstu domaćina.

Genotip CbCRO08 ima jedan uzorak iz Splitsko-dalmatinske županije, a genotip CbCRO04 jedan uzorak iz Zadarske županije. Dva uzorka imaju genotip CbCRO09, a potječu iz Splitsko-dalmatinske i Šibensko-kninske županije.

Genotipovima CbCRO04, CbCRO08, CbCRO09 i CbCRO10 najsrodniji je genotip CbCRO07. Zatim slijede genotip CbCRO03 pa CbCRO05, a nešto udaljeniji od njih je CbCRO06. Genotip CbCRO07 ima samo jedan uzorak i to onaj iz Zadarske županije. Uzorci označeni brojevima 27 i 33 potječu iz istog uzgoja i imaju genotip CbCRO03. Uzorci 27 i 33 su pristigli iz istog uzgoja. Očekivano je da su životinje u istom uzgoju inficirane istim sojem bakterije *C. burnetii* što je potvrđeno genotipizacijom. Uzorci su u Laboratorij zaprimljeni i obrađeni u razmaku od mjesec dana stoga ne postoji mogućnost kontaminacije uzoraka.

Jedini uzorak iz Zagrebačke županije ima genotip CbCRO05. Genotip CbCRO06 ima jedan uzorak koji dolazi iz Ličko-senjske županije, a od svih drugih genotipova razlikuje se u čak tri lokusa: ms12, ms24 i ms34.

Od svih genotipiziranih uzoraka, posebno se ističe uzorak 32. Kod njega se na lokusima ms12, ms26 i ms23 u elektroforezi nakon MLVA PCR reakcija javljaju dva, a na lokusima ms24 i ms34 četiri benda. Po brojevima ponavljanja na svim lokusima najbliži je uzorku 31. Pošto su uzorci 31 i 32 izolirani isti dan ne može se isključiti mogućnost da je uzorak 32 kontaminiran uzorkom 31. Kad se za uzorak 32 zanemare brojevi ponavljanja karakteristični za uzorak 31, kod uzorka 32 se na lokusima ms24 i ms34 i dalje javljaju 3 benda odnosno 3 različita broja ponavljanja. To bi se moglo objasniti time da je koza od koje su dostavljeni organi ploda (označeni kao uzorak 32) inficirana s više različitih sojeva bakterije *C. burnetii*. Lokusi ms24 i ms34 bi također mogli biti hipervarijabilne regije u kojima je zbog insercija i delecija došlo do različitih brojeva ponavljanja.

Genotipizacijom u kojoj se prate lokusi oba panela dobije se 10 genotipova, dok se genotipizacijom istih 14 uzoraka pomoću lokusa samo panela 1 dobije devet genotipova (Tablica 23.). Kad bi se za genotipizaciju koristili lokusi panela 1 bez lokusa ms26 koji ima najveći broj različitih alela, genotipizacijom 14 uzoraka dobilo bi se pet genotipova (Tablica 24.). Genotipizacijom pomoću lokusa panela 2 dobilo bi se također pet genotipova (Tablica 25.), ali različitih od genotipova dobivenih pomoću lokusa panela 1 bez ms26. Genotipovi bakterije *C. burnetii* u Hrvatskoj dobiveni korištenjem 17 lokusa mogli bi se razlikovati korištenjem samo pet lokusa: ms03, ms12, ms26, ms24 i ms34 (Tablica 22.).

Dobiveni MLVA genotipovi su uspoređeni s genotipovima bakterije *C. burnetii* objavljenim na internetskoj stranici <http://minisatellites.u-psud.fr> te s genotipovima objavljenim u radovima Roesta i suradnika (2011.) i Chmielewskog i suradnika (2009.). Genotipovi dobiveni u radovima ovih autora imaju objavljen najveći broj lokusa, 10 i 17, zbog čega su pogodni za usporedbu. Pretpostavka je da su genotipovi Arricau-Bouvery i suradnika (2006.) objavljeni u bazi podataka Coxiella2007 pa je s tim genotipovima usporedba napravljena unutar baze. Klaassen i suradnici (2009.) su genotipizaciju radili samo s 3 lokusa i to s posebno kreiranim početnicama pa zbog toga njihovi genotipovi nisu uspoređeni s dobivenima.

U bazi podataka Coxiella2007 objavljeni su genotipovi bakterije *C. burnetii* koji se temelje na 10 lokusa: ms03, ms12, ms21, ms22, ms30, ms36, ms27, ms28, ms31 i ms34. Kad



se uzmu u obzir samo ti lokusi onda između dobivenih genotipova CbCRO03, CbCRO04, CbCRO08, CbCRO09 i CbCRO10 ne postoji razlika. U tom slučaju hrvatski genotip CbCRO02 u potpunosti se podudara s genotipom francuskog uzorka CbB1. Uzorci s genotipovima CbCRO02 i CbB1 izolirani su iz krava. Genotip CbCRO02 razlikuje se od genotipova uzoraka izoliranih iz krava i koza iz Francuske (CbB1, CbC1 i CbB10) samo u jednom lokusu. Genotip CbCRO06 se od genotipa jednog uzorka označenog kao Tché razlikuje u samo jednom lokusu a njegovo podrijetlo nije navedeno. Svi ostali dobiveni genotipovi razlikuju se od genotipova u bazi u 3 i više lokusa, što je velika razlika jer je navedeno samo 10 od mogućih 17 lokusa. To vrijedi i za genotip CbCRO02 koji se u potpunosti podudara s genotipom francuskog uzorka CbB1, ali samo na 10 lokusa.

Iz dendograma (Slika 29.) kojim se uspoređuju genotipovi u Hrvatskoj i genotipovi u bazi *Coxiella2007* vidljivo je da su genotipovi CbCRO01 i CbCRO02 srodniji s francuskim i jednim njemačkim nego s hrvatskim genotipovima. Genotip CbCRO06 je također srodniji sa slovačkim i jednim talijanskim genotipom nego s hrvatskim genotipovima. Hrvatski genotipovi CbCRO05, CbCRO07 i grupa hrvatskih genotipova koji se korištenjem samo ovih 10 lokusa ne mogu razlikovati (CbCRO03, CbCRO04, CbCRO08, CbCRO09 i CbCRO10) su više srodni međusobno nego s ikojim stranim genotipom.

U bazi podataka *Coxiella2009\_Netherlands* objavljeni su genotipovi bakterije *C. burnetii* na temelju 6 lokusa: ms23, ms24, ms27, ms28, ms33 i ms34. Kad se u obzir uzmu samo ti lokusi onda razlika između dobivenih genotipova CbCRO04, CbCRO05, CbCRO07, CbCRO08, CbCRO09, CbCRO10 ne postoji. Genotip CbCRO02 se i u ovom slučaju pokazao najbližiji stranim genotipovima. Od genotipa dobivenog iz DNA izolirane iz mitralnog zaliska čovjeka iz Marseillea (Francuska, 1994. godine) razlikuje se na dva lokusa. Ostali genotipovi se razlikuju od genotipova objavljenih u bazi podataka *Coxiella2009\_Netherlands* razlikuju na tri i više lokusa.

Dendogram (Slika 35.) prikazuje odnose hrvatskih genotipova i genotipova u bazi *Coxiella2009\_Netherlands*. Iz dendograma je vidljivo da su genotipovi CbCRO01 i CbCRO02 srodniji međusobno nego s francuskim genotipovima, ali da su s francuskim genotipovima srodniji nego ostalim hrvatskim genotipovima. Ostali hrvatski genotipovi su srodniji međusobno nego s ikojim stranim genotipom.

Nizozemski znanstvenici Roest i suradnici (2011.) u genotipizaciji izolata bakterije *C. burnetii* koristili su 10 lokusa: ms03, ms21, ms22, ms28, ms24, ms30, ms31, ms34, ms27 i ms36. Ako se u obzir uzmu samo ti lokusi onda se dobiveni genotipovi CbCRO04,

CbCRO05, CbCRO08, CbCRO09, CbCRO10 međusobno ne razlikuju. Genotipovi CbNL01, CbNL02, CbNL012 i CbNL013 najbliži su hrvatskim genotipovima. Uzorak podrijetlom od koze ima genotip CbNL012, a od genotipa CbCRO02 razlikuje samo u lokusu ms36. Genotip CbNL013, podrijetlom od goveda, se razlikuje od CbCRO01 i CbCRO02 u lokusima ms34 i ms36. Ostali nizozemski genotipovi se od dobivenih razlikuju na četiri i više lokusa, a uz to nemaju navedene brojeve ponavljanja za neke lokuse.

Poljski znanstvenici Chmielewski i suradnici (2009.) su u genotipizaciji sojeva bakterije *C. burnetii* koristili svih 17 lokusa. Poljski izolati pokazuju velike razlike u odnosu na hrvatske genotipove. Hrvatski i poljski genotipovi se razlikuju na najmanje 5 lokusa.

Napravljen je dendrogram usporedbe genotipova bakterije *C. burnetii* u Hrvatskoj s najbližim genotipovima bakterije objavljenim u radu Roesta i suradnika (2011.) (Slika 37.) i radu Chmielewskog i suradnika (2009.) (Slika 39.). Iz dobivenih dendograma vidljivo je da su genotipovi CbCRO01 i CbCRO02 srodniji međusobno nego sa stranim genotipovima, ali da su s nekim stranim genotipovima srodniji nego s ostalim hrvatskim genotipovima. Ostali hrvatski genotipovi su srodniji međusobno nego s ikojim stranim genotipom.

Konstruiran je i dendrogram usporedbe MLVA genotipova bakterije *C. burnetii* u Hrvatskoj s najbližim genotipovima bakterije objavljenim u bazama podataka Coxiella2007 i Coxiella2009\_Netherlands te radovima Chmielewskog i suradnika (2009.) i Roesta i suradnika (2011) (Slika 40.). Usporedba je rađena samo na temelju lokusa koji se javljaju u svim navedenim bazama i radovima, a to je devet lokusa: ms03, ms21, ms22, ms30, ms36, ms27, ms28, ms31 i ms34. U ovoj usporedbi genotip CbCRO02 je opet identičan francuskom genotipu CbB1, a najbliži je s hrvatskim genotipom CbCRO01 i dva francuska genotipa (CbB10 i CbC1). Genotipovi CbCRO01 i CbCRO02 pokazuju nešto veću razliku u odnosu na dva nizozemska (CbNL12 i CbNL13) i jedan njemački (Z3351/92) genotip dok s ostalim hrvatskim genotipovima ne pokazuju nikakvo srodstvo. Genotipovi CbCRO03, CbCRO04, CbCRO05, CbCRO08, CbCRO09 i CbCRO10 su identični ako se u obzir uzima samo ovih devet lokusa, a najbliži su s genotipom CbCRO07, a tek nešto manje srodniji s poljskim genotipovima. Hrvatski genotip CbCRO06 je najbliži s dva slovačka i jednim talijanskim genotipom.

Zaključak koji proizlazi iz svih ovih usporedbi je da su hrvatski genotipovi CbCRO01 i CbCRO02 srodniji s francuskim i nizozemskim nego ostalim hrvatskim genotipovima. Genotipovi CbCRO04, CbCRO08, CbCRO09 i CbCRO10 su identični u svim usporedbama osim kad se prati svih 17 lokusa (usporedba s genotipovima Chmielewskog i suradnika

(2009.)), a u nekim usporedbama su im identični i genotipovi CbCRO03, CbCRO05 i CbCRO07. Preostali genotip CbCRO06 se pokazao srodniji sa slovačkim i talijanskim nego hrvatskim genotipovima. Svi ovi rezultati ipak se trebaju uzeti sa zadržkom jer često je promatrano premalo lokusa i usporedba genotipova na razini svih 17 lokusa bi vjerojatno dala drugačije rezultate. Možda bi tada hrvatski genotipovi pokazali veće srodstvo međusobno nego sa stranim genotipovima kao što su pokazali u usporedbi s genotipovima objavljenim u radu Chmielewskog i suradnika (2009.). Sigurno je jedino da su hrvatski genotipovi CbCRO01 i CbCRO02 potpuno nesrodni s ostalim hrvatskim genotipovima kako je to pokazano u dendogramu međusobne usporedbe hrvatskih genotipova (Slika 20.) i u dendogramu usporedbe s poljskim izolatima (Chmielewski i sur., 2009.) (Slika 39.).

Za svaki lokus korišten u genotipizaciji metodom MLVA izračunat je indeks HGDI. Za 14 genotipiziranih uzoraka, lokusi ms07, ms21 i ms22 imali su samo po jedan alel odnosno ne pokazuju nikakvu diskriminatornu moć ( $HGDI = 0$ ). To ne znači da se genotipizacijom novih uzoraka neće pojaviti novi aleli na tom lokusu. Ostali lokusi su najčešće imali po dva alela i to tako da su tri uzorka imala jedan alel (uzorci genotipa CbCRO01 i CbCRO02), a ostalih 11 uzoraka drugi alel ( $HGDI = 0,363$ ). Nešto veću diskriminatornu moć pokazao je lokus ms24 s četiri alela ( $HGDI = 0,648$ ), dok najveću diskriminatornu moć odnosno najveću raznolikost pokazuje lokus ms26 sa čak sedam alela ( $HGDI = 0,901$ ).

Indeks HGDI za dobivene MLVA genotipove je 0,956; od ukupno 14 uzoraka dobiveno je 10 različitih genotipova. Takav HGDI ukazuje na veliku moć razlučivanja metode MLVA. Kad bi se za genotipizaciju koristili samo lokusi panela 1, 14 uzoraka bi bilo svrstano u devet genotipova (Tablica 23.) i HGDI bi bio 0,934. Takav visoki HGDI ukazuje na veliku moć razlučivanja genotipizacije pomoću panela 1, a rezultat je visokog HGDI-a lokusa ms26 (0,901). Kad bi se za genotipizaciju koristili lokusi panela 1, ali bez lokusa ms26, 14 uzoraka bi bilo svrstano u pet genotipova i indeks HGDI bi bio 0,659 (Tablica 24.). Isto tako genotipizacijom samo pomoću panela 2 dobilo bi se pet genotipova, a HGDI bi bio 0,670 (Tablica 25.).

U svim objavljenim radovima u kojima su sojevi bakterije *C. burnetii* genotipizirani metodom MLVA (Arricau-Bouvery i sur., 2006.; Chmielewski i sur., 2009.; Klaassen i sur., 2009.; Roest i sur., 2011.) i bazama podataka (Coxiella2007 i Coxiella2009\_Netherlands) promatrani su lokusi ms27, ms28 i ms34. U ovom radu lokus ms34 ima HGDI 0,495 čime je

pokazao veću moć razlučivanja od moći razlučivanja drugih lokusa pa bi ga svakako trebalo uzeti u obzir u slaganju panela za genotipizaciju. Za lokuse ms27 i ms28 HGDI u ovom radu je 0,363 kao za još šest drugih lokusa. No kako su ti lokusi korišteni u svim bazama i radovima drugih autora svakako bi ih trebalo uvrstiti u panel za genotipizaciju jer su bitni za usporedbu sa stranim genotipovima. Sljedeći najčešće korišteni lokusi u objavljenim radovima bili su ms24 i ms31. I u ovom radu lokus ms24 je pokazao veću moć razlučivanja od većine lokusa s indeksom HGDI 0,648, dok je HGDI za lokus ms31 0,363 kao za većinu lokusa. Kako su ovi lokusi korišteni u većini radova i baza, a k tome lokus ms24 ima i veću moć razlučivanja od većine lokusa, lokusi ms24 i ms31 bi trebali biti uvršteni u panel za genotipizaciju. U panel za genotipizaciju u Hrvatskoj bi trebalo uvrstiti i lokuse ms03, ms12, ms26. Ti su lokusi uz lokuse ms24 i ms34 dovoljni za razlikovanje svih genotipova u Hrvatskoj. Lokus ms03 je više korišten lokus (u tri rada i jednoj bazi podataka) dok se ms12 koristio manje (u dva rada i jednoj bazi). U ovom radu lokus ms12 ima manju moć razlučivanja od većine lokusa (HGDI 0,275) no u kombinaciji s lokusima ms03, ms26, ms24 i ms34 lokus ms12 je bio presudan za razlikovanje svih 10 genotipova. U ovom radu lokus ms26 se pokazao najvarijabilnijim lokusom s indeksom HGDI 0,901. Kad bi se radila genotipizacija sa svim lokusima, ali bez lokusa ms26, umjesto 10 genotipova u Hrvatskoj bi ih bilo sedam jer bi genotipovi CbCRO04, CbCRO08, CbCRO09 i CbCRO10 bili identični. S tako visokim HGDI lokus ms26 je možda previše nestabilan da bi se koristio za genotipizaciju. S druge strane, u jednom slučaju lokus ms26 pokazao se izuzetno stabilnim. Uzorak 24 iz 2008. godine i uzorak 40 iz 2011. godine imaju identičan genotip CbCRO10. To bi moglo značiti da je taj genotip bakterije *C. burnetii* konzerviran uključujući i lokus ms26. Drugo objašnjenje bi bilo da su svi lokusi tog genotipa nepromijenjeni dok se lokus ms26 stalno mijenja i slučajno ima 17 ponavljanja. Isto je tako mogao imati i 11 (genotip CbCRO04), 13 (genotip CbCRO08) ili 15 ponavljanja (genotip CbCRO09).

U ovom radu lokusi ms07, ms21 i ms22 nisu pokazali nikaku raznolikost. Imali su samo jedan alel dok u drugim radovima pokazuju raznolikost. Lokus ms23 se u ovom radu pokazao dosta problematičan. Od 14 uzoraka, za pet uzoraka nije uspjelo umnažanje PCR produkta na lokusu ms23. Ako DNA nije dovoljno kvalitetna da bi došlo do umnažanja u PCR reakciji, postavlja se pitanje zašto je do umnažanja došlo na drugim lokusima. Objašnjenje bi moglo biti da tog lokusa u nekim sojevima bakterije *C. burnetii* jednostavno nema. Ostali lokusi u ovom radu (ms01, ms20, ms30, ms36 i ms33) imaju svaki samo po dva alela (HGDI = 0,363). U radovima drugih autora i bazama podataka češće su korišteni lokusi ms30, ms36 i ms33, dok su ms01 i ms20 korišteni u samo dva rada.

Panel za genotipizaciju sojeva bakterija *C. burnetii* u Hrvatskoj trebao bi sadržavati minimalno lokuse ms03, ms12, ms26, ms24 i ms34. Radi mogućnosti usporedbe s drugim genotipovima u panel bi mogli biti uključeni i lokusi ms27 i ms28 koji se koriste u svim radovima te ms31, ms21, ms22, ms30 i ms36 koji se koriste u većini radova. No kako je MLVA nova metoda za genotipizaciju bakterije *C. burnetii*, najbolje bi bilo da se veći broj uzoraka genotipizira koristeći svih 17 lokusa te se onda odaberu najprikladniji i najinformativniji lokusi za daljnje korištenje u genotipizaciji.

Pri odabiru lokusa za genotipizaciju u obzir treba uzeti i veličine ponavljajućih sekvenci na tim lokusima. Ponavljajuće sekvence na lokusima panela 2 imaju tek šest ili sedam parova baza. Razlike u veličini odsječaka DNA dobivenih reakcijom PCR za te lokuse ne mogu se precizno odrediti korištenjem gel elektroforeze već se trebaju koristiti uređaji za kapilarnu elektroforezu. Tako se javlja potreba da laboratoriji nabavljaju skuplju opremu čime se smanjuje prednost ove metode nad drugima koje iziskuju skupu laboratorijsku opremu. Pronalaženje novih lokusa s većim ponavljajućim sekvencama bi riješilo problem.

MLVA za genotipizaciju bakterije *C. burnetii* je metoda koja se tek razvija. Sami istraživači odlučuju koje lokuse će koristiti u tipizaciji, a čak i sami dizajniraju početnice koje im više odgovaraju za umnažanje pojedinih lokusa. Zato bi trebalo biti odlučeno koji lokusi i koje početnice će se koristiti. Također, treba biti donesena odluka o tome koja laboratorijska oprema bi se trebala koristiti pri izvođenju metode i prema tome definirati parametre metode. Ako su ponavljajuće sekvence veće onda se može koristiti gel elektroforeza, a ako su manje laboratoriji će morati ulagati u nabavu nove opreme za kapilarnu elektroforezu. Da bi se donosile ikakve daljnje odluke, što veći broj istraživača bi trebao obraditi što veći broj uzoraka te svoje podatke staviti dostupnima drugim istraživačima.

Tek međusobnom suradnjom moći će se stvoriti kvalitetna metoda za genotipizaciju kojom će se dobiti uvid u molekularnu epidemiologiju bakterije *C. burnetii*. Poznavanje epidemiologije bakterije *C. burnetii* će u slučajevima pojave Q-groznice omogućiti utvrđivanje izvora infekcije te donošenje odluke o tome kako reagirati da bi se uklonio izvor i spriječilo širenje infekcije.

## **6. ZAKLJUČAK**

1. Ukupno je pretraženo 2636 uzoraka, prisustvo DNA bakterije *C. burnetii* dokazano je u 231 uzorku, a za genotipizaciju je izabrano 49 uzoraka.
2. Od 49 izabranih uzoraka genotipizacija je uspjela kod 15 uzoraka. Smatramo da genotipizacija ostalih uzoraka nije uspjela jer izolirana DNA nije bila ili dovoljno kvalitetna ili je količina DNA bila premala ili oboje. Potrebno je usavršiti metodu izolacije DNA.
3. 14 uzoraka je svrstano u 10 genotipova CbCRO01, CbCRO02, CbCRO03, CbCRO04, CbCRO05, CbCRO06, CbCRO07, CbCRO08, CbCRO09 i CbCRO10. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je metoda MLVA u ovom slučaju pokazala veliku moć razlučivanja.
4. Lokusi ms07, ms21 i ms22 nisu imali nikakvu moć razlučivanja odnosno svi uzorci su na tim lokusima imali isti broj ponavljanja. Nasuprot tome, lokus ms26 je možda hipervarijabilan. No da bi se moglo tvrditi da neki lokus nema moć razlučivanja ili da je hipervarijabilan, potrebno je obraditi puno veći broj uzoraka.
5. Genotip CbCRO02 u potpunosti se podudara s jednim francuskim genotipom na 10 lokusa no ne može se donijeti zaključak da se radi o istom genotipu jer za francuski genotip nije objavljeno ostalih 7 lokusa. Ostali genotipovi se ne podudaraju ni s jednim objavljenim genotipom i mogu se smatrati endemskim za područje Hrvatske.
6. Genotip CbCRO01 je najsrodniji genotipu CbCRO02, a oba su srodnija stranim nego hrvatskim genotipovima. Karakteristični su za kontinentalni dio Hrvatske.
7. Genotipovi CbCRO04, CbCRO08, CbCRO09 i CbCRO10 jako su srodni i kad bi se promatrali samo lokusi koje je radila većina drugih istraživača, oni bi bili svrstani u isti genotip. Ovi genotipovi endemski su u primorskom dijelu Hrvatske.
8. Panel za genotipizaciju sojeva vrste *C. burnetii* u Hrvatskoj trebao bi sadržavati minimalno lokuse ms03, ms12, ms26, ms24 i ms34. Da bi se mogli uspoređivati s drugim genotipovima u panel bi mogli biti uključeni i lokusi ms27, ms28, ms31, ms21, ms22, ms30 i ms36 koji se koriste u većini radova. No kako je MLVA nova metoda za genotipizaciju bakterije *C. burnetii*, najbolje bi bilo da se veći broj uzoraka

genotipizira koristeći svih 17 lokusa te se onda odaberu najprikladniji i najinformativniji lokusi za daljnje korištenje u genotipizaciji.

9. Metoda MLVA uvedena je kao rutinski dijagnostički postupak čime je omogućeno utvrđivanje izvora i puteva širenja infekcije u realnom vremenu što će pridonijeti kontroli i suzbijanju bolesti u domaćih životinja koje su ujedno primarni izvor zaraze za ljude.



## ***7. POPIS LITERATURE***

1. Aarts HJ, Boumedine KS, Nesme X, Cloeckaert A (2001) Molecular tools for the characterisation of antibiotic-resistant bacteria. *Vet Res* 32:363-380.
2. Aleraj B (2008) Zarazne bolesti u Hrvatskoj 2007. *Infektološki glasnik* 28(3):145–151.
3. Aleraj B (2009) Zarazne bolesti u Hrvatskoj 2008. *Infektološki glasnik* 29(2):57–64.
4. Aleraj B (2010) Zarazne bolesti u Hrvatskoj 2009. *Infektološki glasnik* 30(4):167–175.
5. Amitai Z, Bromberg M, Bernstein M, Raveh D, Keysary A, David D, Pitlik S, Swerdlow D, Massung R, Rzotkiewicz S, Halutz O, Shohat T (2010) A large Q fever outbreak in an urban school in central Israel. *Clin Infect Dis* 50(11):1433-1438.
6. Angelakis E, Raoult D (2010) Q Fever. *Vet Microbiol* 140(3-4):297-309.
7. Arricau-Bouvery N, Hauck Y, Bejaoui A, Frangoulidis D, Bodier CC, Souriau A, Meyer H, Neubauer H, Rodolakis A, Vergnaud G (2006) Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiol* 6:38.
8. Arricau-Bouvery N, Rodolakis A (2005) Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet Res* 36: 327-349.
9. Arricau-Bouvery N, Souriau A, Bodier C, Dufour P, Rousset E, Rodolakis A (2005) Effect of vaccination with phase I and phase II *Coxiella burnetii* vaccines in pregnant goats. *Vaccine* 15;23(35):4392-4402.
10. Arricau-Bouvery N, Souriau A, Lechopier P, Rodolakis A (2003) Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: excretion routes. *Vet Res*34(4):423-433.
11. Baca OG, Klassen DA, Aragon AS (1993) Entry of *Coxiella burnetii* into host cells. *Acta Virol* 37:143-155.
12. Bacci S, Villumsen S, Valentiner-Branth P, Smith B, Krogfelt KA, Mølbak K (2012) Epidemiology and clinical features of human infection with *Coxiella burnetii* in Denmark during 2006-07. *Zoonoses Public Health* 59(1):61-88.

13. Barry AO, Mege JL, Ghigo E (2011) Hijacked phagosomes and leukocyte activation: an intimate relationship. *J Leukoc Biol* 89:373-382.
14. Beare PA, Chen C, Bouman T, Pablo J, Unal B, Cockrell DC, Brown WC, Barbian KD, Porcella SF, Samuel JE, Felgner PL, Heinzen RA (2008) Candidate antigens for Q fever serodiagnosis revealed by immunoscreening of a *Coxiella burnetii* protein microarray. *Clin Vaccine Immunol* 15(12):1771-1779.
15. Beare PA, Samuel JE, Howe D, Virtaneva K, Porcella SF, Heinzen RA (2006) Genetic diversity of the Q fever agent, *Coxiella burnetii*, assessed by microarray-based whole-genome comparisons. *J Bacteriol* 188:2309-2324.
16. Ben Amara A, Ghigo E, Le Priol Y, Lépolard C, Salcedo SP, Lemichez E, Bretelle F, Capo C, Mege JL (2010) *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever, replicates within trophoblasts and induces a unique transcriptional response. *PLoS One* 5:e15315.
17. Benson G (1999) Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 27: 573–580.
18. Benson WW, Brock DW, Mather J (1963) Serologic Analysis of a Penitentiary Group Using Raw Milk From a Q Fever Infected Herd. *Public Health Rep* 78:707-710.
19. Berri M, Laroucau K, Rodolakis A (2000) The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 72: 285-293.
20. Buhariwalla F, Cann B, Marrie TJ (1996 ) A dog-related outbreak of Q fever. *Clin Infect Dis* 23(4):753-755.
21. Capo C, Zaffran Y, Zugun F, Houpiqian P, Raoult D, Mege JL (1996) Production of interleukin-10 and transforming growth factor beta by peripheral blood mononuclear cells in Q fever endocarditis. *Infect Immun* 64(10):4143-4147.
22. Chmielewski T, Sidi-Boumedine K, Duquesne V, Podsiadly E, Thiery R, Tylewska-Wierzbanska S (2009) Molecular epidemiology of Q fever in Poland. *Pol J Microbiol* 58:9–13.

23. Cloeckaert A, Grayon M, Grepinet O, Boumedine KS (2003) Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests. *Microbes Infect* 5:593-602.
24. Cutler SJ, Bouzid M, Cutler RR (2007) Q fever. *J Infect* 54:313-318.
25. Cvetnić Ž, Brkić I, Špičić S, Mitak M (2003) Q-groznica na području Topuskoga 2001. godine. *Vet stn* 34(2):83-88.
26. Delsing CE, Kullberg BJ, Bleeker-Rovers CP (2010) Q fever in the Netherlands from 2007 to 2010. *Neth J Med* 68(12):382-387.
27. Denison AM, Thompson HA, Massung RF (2007) IS1111 insertion sequences of *Coxiella burnetii*: characterization and use for repetitive element PCR-based differentiation of *Coxiella burnetii* isolates. *BMC Microbiol* 7:91.
28. Denoeud F, Vergnaud G (2004) Identification of polymorphic tandem repeats by direct comparison of genome sequence from different bacterial strains: a Web-based ressource. *BMC Bioinformatics* 5:4.
29. Derrick EH (1937) „Q“ fever a new fever entity: clinical features, diagnosis, and laboratory investigation. *Med J Aust* 11:281-299.
30. Dupuis G, Petite J, Péter O, Vouilloz M (1987) An important outbreak of human Q fever in a Swiss Alpine valley. *Int J Epidemiol* 16(2):282-287.
31. Fishbein DB, Raoult D (1992) A cluster of *Coxiella burnetii* infections associated with exposure to vaccinated goats and their unpasteurized dairy products. *Am J Trop Med Hyg* 47(1):35-40.
32. Franciosa G, Tartaro S, Wedell-Neergaard C, Aureli P (2001) Characterization of *Listeria monocytogenes* strains involved in invasive and noninvasive listeriosis outbreaks by PCR-based fingerprinting techniques. *Appl Environ Microbiol* 67:1793-1799.
33. Gerth HJ, Leidig U, Riemenschneider T (1982) [Q-fever epidemic in an institute of human pathology]. *Dtsch Med Wochenschr* 107:1391-1395.

34. Ghigo E, Capo C, Raoult D, Mege JL (2001) Interleukin-10 stimulates *Coxiella burnetii* replication in human monocytes through tumor necrosis factor down-modulation: role in microbicidal defect of Q fever. *Infect Immun* 69(4):2345-2352.
35. Glazunova O, Roux V, Freylikman O, Sekeyova Z, Fournous G, Tyczka J, Tokarevich N, Kovacava E, Marrie TJ, Raoult D (2005) *Coxiella burnetii* genotyping *Emerg Infect Dis* 11:1211-1217.
36. Gozalan A, Rolain JM, Ertek M, Angelakis E, Coplu N, Basbulut EA, Korhasan BB, Esen B (2010) Seroprevalence of Q fever in a district located in the west Black Sea region of Turkey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29(4):465-469.
37. Greenslade E, Beasley R, Jennings L, Woodward A, Weinstein P (2003) Has *Coxiella burnetii* (Q fever) been introduced into New Zealand? *Emerg Infect Dis* 9(1):138-140.
38. Grilc E, Socan M, Koren N, Ucakar V, Avsic T, Pogacnik M, Kraigher A (2007) Outbreak of Q fever among a group of high school students in Slovenia, March-April 2007. *Euro Surveill* 12(7).
39. Hackstadt T, Williams JC (1981 ) Biochemical stratagem for obligate parasitism of eukaryotic cells by *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:3240-3244.
40. Hatchette TF, Hudson RC, Schlech WF, Campbell NA, Hatchette JE, Ratnam S, Raoult D, Donovan C, Marrie TJ (2001) Goat-associated Q fever: a new disease in Newfoundland. *Emerg Infect Dis* 7(3):413-419.
41. Heinzen R, Stiegler GL, Whiting LL, Schmitt SA, Malavia LP, Frazier ME (1990) Use of pulse field gel electrophoresis to differentiate *Coxiella burnetii* strains. *Ann NY Acad Sci* 590:504-513.
42. Heinzen RA, Hackstadt T, Samuel JE (1999) Developmental biology of *Coxiella burnetii*. *Trends Microbiol.* 7: 149-154.
43. Hendrix LR, Samuel JE, Mallavia LP (1991) Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by analysis of restriction-endonuclease-digested DNA separated by SDS-PAGE *J Gen Microbiol* 137:269-276.

44. Hermans MH, Huijsmans CR, Schellekens JJ, Savelkoul PH, Wever PC (2011) *Coxiella burnetii* DNA in goat milk after vaccination with Coxevac. *Vaccine* 29(15):2653-2656.
45. Hilbert A, Reith P, Brockmann SO, Tyczka J, Fischer SF, Piechotowski I, Wagner-Wiening C, Winter CH, Bendak J, Meier C, Spengler D, Miller T, Kleine-Albers C, Renner C, Koepsel U, Hensler E, Henning K, Fröhlich A, Conraths FJ, Kramer M (2011) [Epidemiological enquiries in two Q fever outbreaks in a community of Baden-Württemberg during 2008 and 2009]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 124(7-8):295-302. German
46. Hilbink F, Penrose M, Kovacova E, Kazar J (1993) Q fever is absent from New Zealand. *Int J Epidemiol* 22:945-949.
47. Honstetter A, Ghigo E, Moynault A, Capo C, Toman R, Akira S, Takeuchi O, Lepidi H, Raoult D, Mege JL (2004) Lipopolysaccharide from *Coxiella burnetii* is involved in bacterial phagocytosis, filamentous actin reorganization, and inflammatory responses through Toll-like receptor 4. *J Immunol* 172:3695-3703.
48. Honstetter A, Imbert G, Ghigo E, Gouriet F, Capo C, Raoult D, Mege JL (2003) Dysregulation of cytokines in acute Q fever: role of interleukin-10 and tumor necrosis factor in chronic evolution of Q fever. *J Infect Dis* 187(6):956-962.
49. Hoover TA, Vodkin MH, Williams JC (1992) A *Coxiella burnetii* repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. *J Bacteriol* 174:5540-5548.
50. Hrvatski zavod za javno zdravstvo (2008) Epidemiološki vjesnik. <http://www.hzjz.hr/epidemiology/news/index0805.htm>; May 2008.
51. Hrvatski zavod za javno zdravstvo (2010) Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2009. godinu. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb [http://www.hzjz.hr/publikacije/hzs\\_ljetopis/Ljetopis\\_Yearbook\\_HR\\_2009.pdf](http://www.hzjz.hr/publikacije/hzs_ljetopis/Ljetopis_Yearbook_HR_2009.pdf)
52. Hrvatski zavod za javno zdravstvo (2011) Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2010. godinu. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb [http://www.hzjz.hr/publikacije/hzs\\_ljetopis/Ljetopis\\_Yearbook\\_HR\\_2010.pdf](http://www.hzjz.hr/publikacije/hzs_ljetopis/Ljetopis_Yearbook_HR_2010.pdf)

53. Hunter PR, Gaston MA (1988) Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 26:2465–2466.
54. Huijsmans CJ, Schellekens JJ, Wever PC, Toman R, Savelkoul PH, Janse I, Hermans MH (2011) Single-nucleotide-polymorphism genotyping of *Coxiella burnetii* during a Q fever outbreak in The Netherlands. *Appl Environ Microbiol* 77(6):2051-2057.
55. Jäger C, Lautenschlager S, Willems H, Baljer G (2002) *Coxiella burnetii* plasmid types QpDG and QpH1 are closely related and likely identical. *Vet Microbiol* 89: 161-166.
56. Jäger C, Willems H, Thiele D, Baljer G (1998) Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates. *Epidmiol Infect* 120:157-164.
57. Kim SG, Kim EH, Lafferty CJ, Dubovi E (2005) *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples, United States. *Emerg Infect Dis* 11:619-621.
58. King LA, Goirand L, Tissot-Dupont H, Giunta B, Giraud C, Colardelle C, Duquesne V, Rousset E, Aubert M, Thiéry R, Calatayud L, Daurat G, Hocqueloux L, Cicchelerio V, Golliot F, de Valk H (2011) Outbreak of Q fever, Florac, Southern France, Spring 2007. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11(4):341-347.
59. Klaassen CH, Nabuurs-Franssen MH, Tilburg JJ, Hamans MA, Horrevorts AM (2009) Multigenotype Q fever outbreak, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 15:613–614.
60. Klee SR, Tyczka J, Ellerbrok H, Franz T, Linke S, Baljer G, Appel B (2006) Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. *BMC Microbiol* 6:2.
61. Koch A, Svendsen CB, Christensen JJ, Bundgaard H, Vindfeld L, Christiansen CB, Kemp M, Villumsen S (2010) Q fever in Greenland. *Emerg Infect Dis*. 16(3):511-513.
62. Kocianová E, Kováčová EI, Literák I (2001) Comparison of virulence of *Coxiella burnetii* isolates from bovine milk and from ticks. *Folia Parasitol (Praha)* 48(3):235-239.

63. Kruszevska D, Tylewska-Wierbanowska S (1993) *Coxiella burnetii* penetration into the reproductive system of male mice, promoting sexual transmission of infection. Infect Immun 61:4188–4195.
64. Kruszevska D, Tylewska-Wierbanowska S (1997) Isolation of *Coxiella burnetii* from bull semen. Res Vet Sci 62:299–300.
65. Kuzman I (2006) *Coxiella burnetii* (Q-groznica) U: Begovac J, Božinović D, Lisić M, Barišić B, Schonwald S (ed.) Infektologija. Profil, Zagreb, 546-550.
66. La Scola B, Lepidi H, Raoult D (1997) Pathologic changes during acute Q fever: influence of the route of infection and inoculum size in infected guinea pigs. Infect Immun 65(6):2443-2447.
67. Lautenschläger S, Willems H, Jäger C, Baljer G (2000) Sequencing and characterization of the cryptic plasmid QpRS from *Coxiella burnetii*. Plasmid. 44:85-88.
68. Le Flèche P, Hauck Y, Onteniente L, Prieur A, Denoeud F, Ramisse V, Sylvestre P, Benson G, Ramisse F, Vergnaud G (2001) A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis* BMC Microbiol 1:2.
69. Leone M, Honstettre A, Lepidi H, Capo C, Bayard F, Raoult D, Mege JL (2004) Effect of sex on *Coxiella burnetii* infection: protective role of 17beta-estradiol. J Infect Dis 189(2):339-345.
70. Li Q, Niu D, Wen B, Chen M, Qiu L, Zhang J (2005) Protective immunity against Q fever induced with a recombinant P1 antigen fused with HspB of *Coxiella burnetii*. Ann N Y Acad Sci 1063:130-142.
71. Madariaga MG, Rezai K, Trenholme GM, Weinstein RA (2003) Q fever: a biological weapon in your backyard. Lancet Infect Dis 3: 709-721.
72. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG (1998) Multilocus



- sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3140-3145.
73. Marmion BP, Ormsbee RA, Kyrkou M, Wright J, Worswick DA, Izzo AA, Esterman A, Feery B, Shapiro RA (1990) Vaccine prophylaxis of abattoir-associated Q fever: eight years' experience in Australian abattoirs. *Epidemiol Infect* 104(2):275-287.
74. Marmion BP, Sukocheva O, Storm PA, Lockhart M, Turra M, Kok T, Ayres J, Routledge H, Graves S (2009) Q fever: persistence of antigenic non-viable cell residues of *Coxiella burnetii* in the host--implications for post Q fever infection fatigue syndrome and other chronic sequelae. *QJM* 102:673-684.
75. Marrie TJ (2003) *Coxiella burnetii* pneumonia. *Eur Respir J* 21:713-719.
76. Maurin M, Raoult D (1999) Q fever. *Clin Microbiol Rev* 12: 518-553.
77. McCaul TF, Williams JC (1981) Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. *J Bacteriol* 147:1063-1076.
78. Medić A, Dželalija B, Punda-Polić V, Gjenero-Margan I, Turković B, Gilić V (2005) Q fever epidemic among employees in a factory in the suburb of Zadar, Croatia. *Croat Med J* 46(2):315-319.
79. Meghari S, Bechah Y, Capo C, Lepidi H, Raoult D, Murray PJ, Mege JL (2008) Persistent *Coxiella burnetii* infection in mice overexpressing IL-10: An efficient model for chronic Q fever pathogenesis *PLoS Pathog* 4(2):e23.
80. Milazzo A, Hall R, Storm PA, Harris RJ, Winslow W, Marmion BP (2001) Sexually transmitted Q fever. *Clin Infect Dis* 33:399-402.
81. Ministarstvo poljoprivrede, Naredba o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju. NN 17/12; NN 1/11; NN 7/10; NN 151/08; NN 134/07; NN 2/07; NN 155/05; NN 189/04; NN 204/03
82. Mulić R, Petričević J, Kljajić Z, Poljak NK, Ropac D (2010) Q fever in Croatia: war-induced changes in epidemiological characteristics. *Coll Antropol* 34(3):859-864.

83. Murphy M, Minihan D, Buckley JF, O'Mahony M, Whyte P, Fanning S (2008) Multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) of Irish verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 from feedlot cattle: uncovering strain dissemination routes. *BMC Vet Res* 4:2.
84. Ning Z, Yu SR, Quan YG, Xue Z (1992) Molecular characterization of cloned variants of *Coxiella burnetii* isolated in China. *Acta Virol* 36:173-183.
85. Ormsbee R A (1952) The growth of *Coxiella burnetii* in embryonnated eggs. *J Bacteriol* 63:73.
86. Oyston PC, Davies C (2011) Q fever: the neglected biothreat agent. *J Med Microbiol* 60(Pt 1):9-21.
87. Palmer NC, Kierstead M, Key DW, Williams JC, Peacock MG, Vellend H (1983) Placentitis and Abortion in Goats and Sheep in Ontario Caused by *Coxiella burnetii*. *Can Vet J* 24(2):60-61.
88. Panaiotov S, Ciccozzi M, Brankova N, Levterova V, Mitova-Tiholova M, Amicosante M, Rezza G, Kantardjiev T (2009) An outbreak of Q fever in Bulgaria. *Ann Ist Super Sanita* 45(1):83-86.
89. Pedersen UB, Hansen JE (2008) Assessment tools in support of epidemiological investigation of airborne dispersion of pathogens. *Am J Disaster Med* 3(6):327-333.
90. Perrin TK, Bengtson IA (1942) The histopathology of experimental Q fever in mice. *Public Health Rep* 57:790-794.
91. Pinsky RL, Fishbein DB, Greene CR, Gensheimer KF (1991) An outbreak of cat-associated Q fever in the United States. *J Infect Dis* 164:202-204.
92. Pittman PR, Norris SL, Coonan KM, McKee KT Jr (2005) An assessment of health status among medical research volunteers who served in the Project Whitecoat program at Fort Detrick, Maryland. *Mil Med* 170(3):183-187.
93. Porter SR, Czaplicki G, Mainil J, Guattéo R, Saegerman C (2011a) Q Fever: current state of knowledge and perspectives of research of a neglected zoonosis. *Int J Microbiol* 2011:248418. Epub 2011 Dec 13.

94. Porter SR, Czaplicki G, Mainil J, Horii Y, Misawa N, Saegerman C (2011b) Q fever in Japan: an update review. *Vet Microbiol* 149(3-4):298-306.
95. Qiagen (2011) QIAxcel DNA Handbook. 2<sup>nd</sup> edn Press, New York
96. Raoult D, Houpikian P, Tissot Dupont H, Riss JM, Arditi-Djiane J, Brouqui P (1999) Treatment of Q fever endocarditis: comparison of 2 regimens containing doxycycline and ofloxacin or hydroxychloroquine. *Arch Intern Med* 159(2):167-173.
97. Roest HI, Ruuls RC, Tilburg JJ, Nabuurs-Franssen MH, Klaassen CH, Vellema P, van den Brom R, Dercksen D, Wouda W, Spierenburg MA, van der Spek AN, Buijs R, de Boer AG, Willemsen PT, van Zijderveld FG (2011) Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* from ruminants in Q fever outbreak, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 17:668-675.
98. Schimmer B, Ter Schegget R, Wegdam M, Züchner L, de Bruin A, Schneeberger PM, Veenstra T, Vellema P, van der Hoek W (2010) The use of a geographic information system to identify a dairy goat farm as the most likely source of an urban Q-fever outbreak. *BMC Infect Dis* 10:69.
99. Schneeberger PM, Hermans MH, van Hannen EJ, Schellekens JJ, Leenders AC, Wever PC (2010) Real-time PCR with serum samples is indispensable for early diagnosis of acute Q fever. *Clin Vaccine Immunol* 17(2):286-290.
100. Seshadri R, Paulsen IT, Eisen JA, TD R, Nelson KE, Nelson WC, Ward NL, Tettelin H, Davidsen TM, Beanan MJ, Deboy RT, Daugherty SC, Brinkac LM, Madupu R, Dodson RJ, Khouri HM, Lee KH, Carty HA, Scanlan D, Heinzen RA, Thompson HA, Samuel JE, Fraser CM, Heidelberg JF (2003) Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:5455-5460.
101. Shannon JG, Heinzen RA (2009) Adaptive immunity to the obligate intracellular pathogen *Coxiella burnetii*. *Immunol Res* 43:138-148.
102. Sia EA, Butler CA, Dominska M, Greenwell P, Fox TD, Petes TD (2000) Analysis of microsatellite mutations in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae* *PNAS* 97:250-255.

103. Sidi-Boumedine K, Rousset E (2011) Molecular epidemiology of Q fever: a review of *Coxiella burnetii* genotyping methods and main achievements. EuroReference 5:30-37.
104. Sidi-Boumedine K, Rousset E, Henning K, Ziller M, Niemczuck K, Roest HIJ, Thiéry R (2010) Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of Q-fever in animals in the European Union. EFSA Scientific Report on Question No EFSA-Q-2009-00511. [www.efsa.europa.eu](http://www.efsa.europa.eu)
105. Stein A, Raoult D (1998) Q fever during pregnancy: a public health problem in southern France. Clin Infect Dis 27:592-596.
106. Stein A, Raoult D (1999) Pigeon pneumonia in provence: a bird-borne Q fever outbreak. Clin Infect Dis 29:617-620.
107. Stein A, Saunders NA, Taylor AG, Raoult D (1993) Phylogenic homogeneity of *Coxiella burnetii* strains as determined by 16S ribosomal RNA sequencing. FEMS Microbiol Lett 113:339-344.
108. Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C (2000) Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome Mol Microbiol 36: 762-771.
109. Svraka S, Toman R, Skultety L, Slaba K, Homan WL (2006) Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii*. FEMS Microbiol Lett 254(2):268-274.
110. Thiele D, Willems H (1994) Is plasmid based differentiation of *Coxiella burnetii* in 'acute' and 'chronic' isolates still valid? Eur J Epidemiol 10:427-434.
111. Thiele D, Willems H, Haas M, Krauss H (1994) Analysis of the entire nucleotide sequence of the cryptic plasmid QpH1 from *Coxiella burnetii* Eur J Epidemiol 10(4):413-420.
112. Tigertt WD, Benenson AS, Gochenour WS (1961) Airborne Q fever. Bacteriol Rev 25:285-293.
113. Tissot-Dupont H, Raoult D, Brouqui P, Janbon F, Peyramond D, Weiller PJ, Chicheportiche C, Nezri M, Poirier R (1992) Epidemiologic features and clinical

- presentation of acute Q fever in hospitalized patients: 323 French cases. *Am J Med* 93:427-434.
114. Tissot-Dupont H, Amadei MA, Nezri M, Raoult D (2004) Wind in November, Q fever in December. *Emerg Infect Dis* 10(7):1264-1269.
115. Tissot-Dupont H, Torres S, Nezri M, Raoult D (1999) Hyperendemic focus of Q fever related to sheep and wind. *Am J Epidemiol* 150(1):67-74.
116. Tissot-Dupont H, Vaillant V, Rey S, Raoult D (2007) Role of sex, age, previous valve lesion, and pregnancy in the clinical expression and outcome of Q fever after a large outbreak. *Clin Infect Dis* 44(2):232-237.
117. To H, Htwe KK, Kako N, Kim HJ, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K (1998) Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle with reproductive disorders. *J Vet Med Sci* 60(7):859-861.
118. Vaidya VM, Malik SV, Bhilegaonkar KN, Rathore RS, Kaur S, Barbuddhe SB. Prevalence of Q fever in domestic animals with reproductive disorders (2010) *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 33(4):307-321.
119. Valkova D, Kazar J (1995) A new plasmid (QpDV) common to *Coxiella burnetii* isolates associated with acute and chronic Q fever *FEMS Microbiol Lett* 125:275-280.
120. Van Wijk MJ, Hogema BM, Maas DW, Bokhorst AG (2011) A Q Fever Outbreak in the Netherlands: Consequences for Tissue Banking. *Transfus Med Hemother* 38(6):357-364.
121. Vilibić-Čavlek T, Kučinar J, Ljubin-Sternak S, Kolarić B, Kaić B, Lazarić-Štefanović L, Hunjak B, Mlinarić-Galinović G (2012) Prevalence of *Coxiella burnetii* Antibodies Among Febrile Patients in Croatia, 2008-2010. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12(4):293-296.
122. Vjesnik (2008) Istarske golfere pokosila Q-groznica? [www.vjesnik.hr](http://www.vjesnik.hr), 17. travnja 2008.
123. Vodkin MH, Williams JC, Stephenson EH (1986) Genetic heterogeneity among isolates of *Coxiella burnetii*. *J Gen Microbiol* 132:455-463.

124. Voth DE, Beare PA, Howe D, Sharma UM, Samoilis G, Cockrell DC, Omsland A, Heinzen RA (2011) The *Coxiella burnetii* cryptic plasmid is enriched in genes encoding type IV secretion system substrates. J Bacteriol 193(7):1493-1503.
125. Voth DE, Heinzen RA (2007) Lounging in a lysosome: the intracellular lifestyle of *Coxiella burnetii*. Cell Microbiol 9:829-840.
126. Voth DE, Howe D, Heinzen RA (2007) *Coxiella burnetii* inhibits apoptosis in human THP-1 cells and monkey primary alveolar macrophages. Infect Immun 75:4263-4271.
127. Waag DM (2007) *Coxiella burnetii*: host and bacterial responses to infection. Vaccine 25(42):7288-7295.
128. Waag DM, England MJ, Bolt CR, Williams JC (2008) Low-dose priming before vaccination with the phase I chloroform-methanol residue vaccine against Q fever enhances humoral and cellular immune responses to *Coxiella burnetii*. Clin Vaccine Immunol 15(10):1505-1512.
129. WHO (1970) Health Aspects of Chemical and Biological Weapons, 1st edn. Geneva: World Health Organization.
130. WHO (2004) Health Aspects of Chemical and Biological Weapons, 2nd edn. Geneva: World Health Organization.
131. Willems H, Ritter M, Jäger C, Thiele D (1997) Plasmid-homologous sequences in the chromosome of plasmidless *Coxiella burnetii* Scurry Q217. J Bacteriol 179:3293-3297.
132. Willems H, Thiele D, Frölich-Ritter R, Krauss H (1994) Detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk using the polymerase chain reaction (PCR). Zentralbl Veterinarmed B 41:580-587.
133. World Organisation for Animal Health. Q-Fever. U: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2011. [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.01.12\\_Q-FEVER.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.12_Q-FEVER.pdf). 17.10.2011.
134. Zekanović D, Morović M, Borcilo MN, Rode OD (2010) First case of Q fever endocarditis in Croatia and a short review. Coll Antropol 34(3):1135-1137.

135. Zhang G, Russell-Lodrigue KE, Andoh M, Zhang Y, Hendrix LR, Samuel JE (2007) Mechanisms of vaccine-induced protective immunity against *Coxiella burnetii* infection in BALB/c mice. J Immunol 179(12):8372-8380.
136. Zhang Y, Zhang G, Hendrix LR, Tesh VL, Samuel JE (2012) *Coxiella burnetii* Induces Apoptosis during Early Stage Infection via a Caspase-Independent Pathway in Human Monocytic THP-1 Cells. PLoS One 7:e3084.

## ***ŽIVOTOPIS AUTORA***

Ivana Račić rođena je 24. lipnja 1980. godine u Zagrebu. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Zagrebu. Godine 2005. diplomirala je na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na smjeru molekularna biologija.

Za vrijeme studija volontirala je u laboratoriju Odsjeka za molekularnu dijagnostiku Kliničkog zavoda za kemiju Kliničke bolnice „Sestre Milosrdnice“ u Zagrebu. Diplomski rad pod naslovom „Kloniranje i ekspresija gena za fuzijski protein - receptor za interleukin-10 i imunoglobulin G“ izradila je u Laboratorijima za biokemiju i molekularnu biologiju u PLIVI - Istraživačkom institutu d.o.o. u periodu od lipnja 2003. do svibnja 2004. godine. Nakon završenog studija, u studenom 2005. godine volontirala je u laboratoriju Zavoda za molekularnu medicinu u Institutu „Ruđer Bošković“. U svibnju 2006. godine zapošljava se u Poliklinici za dermatovenerologiju, infektologiju i citologiju u laboratoriju za molekularnu dijagnostiku. U lipnju 2007. godine zapošljava se u KBC-u Zagreb na radnom mjestu biologa, prvo u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku, a zatim u Zavodu za tipizaciju tkiva. Od siječnja 2009. godine zaposlena je na mjestu asistentice u Laboratoriju za bakterijske zoonoze i molekularnu dijagnostiku bakterijskih bolesti Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu.

U ožujku 2009. godine upisala je Poslijediplomski doktorski studij Biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Znanstveni novak postaje 1. srpnja 2011. godine.

U travnju 2010. godine boravila je na Institutu za mikrobiologiju i parazitologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Ljubljani na stručnom usavršavanju u molekularnoj identifikaciji uzročnika tuberkuloze. U lipnju 2012. godine boravila je na Institutu „G. Caporale“ u Teramu u Italiji na radionici o metodi MLST.

Do sada je u koautorstvu objavila 31 rad u domaćim i stranim časopisima, od toga 6 radova u časopisima citiranim u bazi Current Contents.

Aktivno se služi engleskim i njemačkim jezikom.